جامعة دمشق – كلية العلوم
قسم علم الحياة الحيوانية

هيئة الطاقة الذرية السورية
قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير بعنوان

تطبيق تقنية الأضداد النانوية في تمييز البروسيلا عن اليرسينيا

Application of Nanobodies technique in *Brucella* diagnosis from *Yersinia enterocolitica* O9

إعداد الطالبة
علياء اسماعيل النعوفي

بإشراف

المشرف الرئيسي
أ.د. عبد الرحمن مراد

المشرف المشارك
د. أيمن المريري

التعاون العلمي
د. عبد القادر عبادي

29 –11– 2010

الإهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

أسطورتي في الحياة ، ومحط افتخاري رمز الأبوة الصادقة، رمز العطاء والتضحية ، من ذاق مر الحياة لنتذوق حلوها من كافح وتعب كثيراً، صاحب اليدين المعطاءتين التي طالما غرست بها غراسك حتى أصبحت اليوم بالخير يانعة والحب والعلم والنقاء بدعائك كان النجاح ، وبرضاك صار الحلم حقيقة، القلب الكبير الذي اسأل الله أن يجعلني قرة عين له .

حبي الأبدي والدي الغالي

البحر الكبير الذي لا تنفذ جواهره وكنوزه، البسمة الدافئة ، الحب الصافي ، والقلب الصادق ، أعطت من روحها وقلبها أعظم ما يكون العطاء ، مصدر فخري واعتزازي أعذب لحن للحب والعطاء من سينتشر شذاها في دنياي للأبد وفقني الله لبرك ورضاك .

أجمل نداء أمي الحبيبة

زهرات حياتي أنا وأنتم غراس نمت في حضن أبوينا لنكون مفاتيح الخير لأمتنا يا رفاق دربي من يجري حبهم في مجرى دمي .

نعمة الله علي أخوتي

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

مرت الايام سريعاً ولم يبق منها في النفس إلا ذكراها، سنوات من الجهد والاجتهاد مضت وما هي إلا بداية لجهد واجتهاد أعظم .

بداية أتقدم بالشكر الجزيل لأعضاء لجنة الحكم الأستاذ الدكتور عبد الرحمن مراد والأستاذ الدكتور محمود قويدر والدكتور بسام البلعة لقبولهم تحكيم ومناقشة هذه الأطروحة، وأقدر بعمق توجيههم وخبرتهم وأشكرهم على ملاحظاتهم القيمة .

عندما يكبر الموقف تتواضع الكلمات حقاً ، من تفضل علي في الإشراف وقدم لي كل نصح وإرشاد ، وأعطاني بلا حدود ، من كان لي أباً ومعلماً ومرشداً في دروب العلم . بحر في العطاء من كان نعم المعين لي ، لك أن تفخر بالمئات من الشباب الذين تخرجوا من تحت يديك وسجلوا نجاحاتهم في مختلف ميادين الحياة ولي الفخر بأنني منهم .

أستاذي الدكتور عبد الرحمن مراد

شامخاً بالعلم ، متأصلاً بالمعرفة، طيب بنفسه، قوي بشخصه، أعماله كبيرة وانشغالاته كثيرة بعبء المسؤوليات التي يحملها ورغم ذلك دائما يجد الوقت لتوجيهي ومناقشتي وتعليمي، من نجاحاتك ورثت الإرادة فكنت المثل والقدوة أزلت من دربي الأشواك حتى صار لتعبك معنى مقدساً، وأصبح نجاحي من عرقك وأنا أضع أول لبنة في صرح مستقبلي يقف القلم عاجزاً عن شكرك فلم أجد كلمة في معاجم اللغات ولا في سطور المقالات تستحق شرف الارتقاء لشكرك .

الدكتور أيمن المريري

أكبر من الكلمات ، وأعظم من الحروف ، نعم المعين في خضم علم واسع قدوتي في العلم والتفاني والإخلاص في العمل، السند العظيم في طريق العلم والمعرفة ، أغرقتني بصنائعك العظيمة وبذلت كل جهد وعون في إدخال جوهر هذا العلم إلى قلبي ، لم تبخل علي بعلمك العظيم وكنت معطاء بدون حساب زرعت في نفسي الطموح وبعثت فيها الأمل صاحب الفضل الذي لا ينتسى، جزاك الله كل الخير .

الدكتور عبد القادر عبادي

الروح النابضة بصفاء القلب، قدوتي في العلم والنبل ، أسعدني الله بلقائك، مددتني بواسع علمك ومعرفتك و استمديت منك الثقة والقوة . الكلمات تقف عاجزة والعبارات تائهة وسطور الشكر في غاية الصعوبة لأنني أشعر دوماً بعدم إيفائها حقك ، كفاني فخراً أني عرفت شخصاً مثلك بروعة علمك وأصالة أخلاقك ووفائك .

الدكتور بسام البلعة

رجل الثقافة والعلم من كونت علمي من عصارة عقله وأغدق علي بعلمه وعطاءه الكثير من أكن له فائق الشكر والتقدير والاحترام .

الدكتور مازن صافي

من جعلتني أقدس الصداقة كثيراً وأضعها في أسمى مراتب الحياة، إلى الأخت التي لم تلدها أمي، وجدت فيكِ أجمل معاني الصداقة والأخوة، من جعلت لحياتي طعم ولوجودي معنى، كنتِ الدعامة التي ارتكز عليها والسند العظيم في حياتي، قطعنا معاً طريق التطلع للعلم والسمو للقمة، علمتني العطاء وكنتِ معطاءة دون حساب.

هبة المنعم وهدية المولى عز وجل عبير الخضراوي

الشجرة المعطاءة التي جلست في ظلها، وجنيت من ثمارها العلم والمعرفة والإخلاص، أغرقتني بصنائعها الجميلة دون حساب.

جنى مير أسعد

الزهور المتفتحة في ربيع أيامي، والنجوم التي ملأت سمائي بهجة، من أحبو لي ما أحبوه لأنفسهم

قضيت معكم أجمل أيام حياتي، وتقاسمنا الحب والإخلاص والوفاء، الشمعات الدائمة الضياء في حياتي.

رنا سايس علياء الشلاح دانا زعيتر عزة الشايب و مايا حلاق

النجم الساري في سما أفقي، من زرع الأمل والبسمة على شفتي، منبع العلم الدافق، وجدت فيك حسن الصداقة، وطيب المعرفة، وجميل الروح وعذب اللقاء، تحتار كلماتي وتعجز عن التعبير عن امتناني وشكري لك، أدعو الله أن يزيدك في السمو والعلم والمعرفة.

الأستاذ حمزة الأموي

القلوب الطاهرة التي كانت سراج طريقي، أنارتم لي الدرب القويم وفتحتم لي أبواب الخير العظيم، سرتوا معي الدرب الطويل وشاركتموني أفراحي وأحزاني، وتحملتم أخطائي وهبتموني ما أعجز عن شكره وشملتموني بالحب والعطف والتقدير كل عبارات الشكر لن تفي أحد منكم حقه.

أعضاء دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات قسم التقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية وأخص بالذكر:

دينا علي، رند عكل، ونيرمين حاج محمود، ليلى حلاب، ليلى رمضان، رزان حمود، ربا عودة، غالية الحبال، منال حويجة، أنس اللحام، بشار رشود، ربيع زهيرة، محمد سعيد، محمد صبرة، فواز الشولي، غياث سويد، باسل العبيد، وليد ملوك، حسام الدين خلف. وكل العاملين في دائرة الصبغيات وأخص منهم الدكتور وليد الأشقر وصباح نويدر وأيمن الأبلوج وهاني سعيد وبثينة الأشقر.

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى رئاسة قسم علم الحياة الحيوانية وجميع الأساتذة والعاملين وكل الشكر والتقدير للأستاذ **الدكتور عصام قاسم عميد** كلية العلوم لتعاونه الشديد معنا وتقديمه كافة التسهيلات الممكنة.

أخيراً، أعرب عن شكري وامتناني إلى **الدكتور إبراهيم عثمان**، مدير هيئة الطاقة الذرية السورية، لجهوده الحثيثة في دعم العلم والمعرفة، ولتفضله بالموافقة على استضافتي لإنجاز رسالتي في مخابر الهيئة.

وأشكر الدكتور نزار مير علي رئيس قسم التقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية لتقديمه كافة التسهيلات وفتح أبواب العلم في طريقنا ولحسن استضافتي في مخابره.

أسعفتني الذاكرة بذكر بعض من ساعدوني والوصول إلى هنا ملؤوا في الفؤاد حبا ونثروا في زواياه فرحا وليعذرني كل من نسي عقلي ففي الفؤاد له منزلة ومقام ولم يعد لدي ما أقدمه سوى دعائي لكم بالتوفيق والنجاح.

فهرس المواضيع

فهرس الاشكال

فهرس الجداول

الاختصارات

APS	Ammonium persulfate	امونيوم بيرسلفات
B	*Brucella*	البروسيلا
BSA	Bovine Serum Albumin	ألبومين مصل البقر
CTAB	Ctyle Trimityle Amino Bromide	ستيل ثلاثي متيل أمينو البرومايد
E.coli	*Escherichia coli*	الإشيريكية القولونية
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid	ايتلين ثنائي الامين رباعي حمض الخل
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay	المقايسة المناعية الأنزيمية
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ثنائي متيل سلفوكسيد
Fab	Fragment-antigen binding	الشدفة الرابطة للمستضد
FITC	Fluorescein isothiocyanate	فلوروسين ايزو سيانات الكبريت
Hepes	Hyroxy ethyl piperazine ethane sulfuric acid	هيدروكسيد ايتيل بيبيرازين ايتان حمض السلفوريك
IPTG	Isopropylthio-D- galactoside	إيزوبروبيل الغلاكتوزيد
kDa	Kilo Dalton	كيلو دالتون
LPS	Lipopolysaccharide	متعدد السكاريد الليبيدي
OD	Optical Density	الكثافة الضوئية
PBS	Phosphate Buffered Saline	محلول فوسفات الموقي الملحي
PEG	Polyethylene Glycol	غليكول عديد الاتيلين
PCR	Polymerase Chain Reaction	تفاعل البلمرة
PIK	Protease Inhibitor Kocktail	مزيج تثبيط البروتياز
PMSF	Phenyl Methane Sulphonyl Fluoride	فينيل ميتان سلفونيل الفلوريد
SCFV	single-chain fragment variable	الشدفة المتغيرة وحيدة السلسلة
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	سلفات دوديسيل الصوديوم
SDS-PAGE	SDS- Poly Acrylamyde Gel Elcetrophoresis	هلامة رحلان عديد الاكريلاميد
TAE	Tris Asetic EDTA	ثلاثي استيل
TEMED	Tetramethylethylenediamine	رباعي ميثيل إيتيلين ثنائي الأمين
TEA	Triethylamine	ثلاثي ايتيل أمين
TES	Tris/ EDTA/ Sucrose	موقي يحتوي التريس/ سكروز/ EDTA
TMB	Tetra Methyl Benzidine	رباعي ميتيل البنزدين
VHH	Variable domain of Heavy-chain antibody	المنطقة المتغايرة للأضداد ذات السلسلة الثقيلة
Y	*Yersinia enterocolitica*	اليرسينيا

ملخص:

يعتبر داء البروسيلات (Brucellosis) من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان، حيث تسببه بكتيريا سالبة الغرام من جنس البروسيلا التي تحوي في غلافها الخارجي على طبقة سميكة من متعدد السكاريد اللبيدي الذي يعد من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية. غير أنه يبدي شبها كبيراً، تصل حتى نسبة 98% في بنية السلسلة O الداخلة في تركيبه، مع اليرسينيا ذات النمط المصلي O:9 مما يتسبب غالباً بالتباس في قراءة النتائج وصحتها.

تعتبر تقنية الأضداد النانوية من طرائق البيولوجيا الجزيئية الحديثة التي تتم من خلال الهندسة الوراثية لنوع خاص من الأضداد التي توجد حصرياً عند عائلة الجمال، بحيث تتيح الحصول على جزيئات رابطة صغيرة الحجم تدعى بالأضداد النانوية (Nanobodies)، وهي تمتاز بكونها عالية الثباتية والانحلالية وسهلة الإنتاج بطرائق التعبير المورثي في الإشريكية القولونية. تنتج هذه الأشكال الضدية على شكل مكتبة مورثية (GeneLibrary) عالية التنوع بحيث يتم غربلتها وعزل الأشكال الضدية الفعالة منها بتقنية الفاجات العارضة، و تكون هذه الأشكال الضدية في مراحلها الأولى على شكل فاجات عارضة للأضداد النانوية.

أجري هذا العمل باستخدام مكتبة مورثية للأضداد النانوية منتجة من جمل ممنع بخلاصات بكتيرية للبروسيلا الضأنية، حيث تم غربلة هذه المكتبة المورثية بصورة طرحية بمتعدد السكاريد اللبيدي المحضر من اليرسينيا ومن ثم ذاك الخاص بالبروسيلا. نتيجة لذلك تم الحصول على عدد من الفاجات العارضة لأضداد نانوية مختلفة فيما بينها وقادرة على التمييز بين هذين الجنسين. بعد ذلك تم إعادة تنسيل مورثات الأضداد النانوية المنتقاة في بلازميد التعبير البروتيني مما مكننا من الحصول على الاضداد النانوية بصورة نقية، ولدى اختبارها أبدت جميعها قدرة على تميز البروسيلا عن اليرسينيا سواء بتجربة المقايسة المناعية الانزيمية التي أجريت على متعدد السكاريد اللبيدي النقي أو بتجربة التبصيم البكتيري المناعي التي أجريت على البكتيريا ككل. يمكن لنتيجة هذا العمل أن تسهم بصورة فعالة في تطوير أطقم تشخيصية دقيقة وسريعة للتمييز بين الإصابات بالبروسيلا و اليرسينيا.

الكلمات المفتاحية:

متعدد السكاريد اللبيدي، البروسيلا، اليرسينيا، الأضداد النانوية و الفاجات العارضة.

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease caused by negative gram bacteria belonging to the genus *Brucella*. These bacteria contain in their outer cell wall a thick layer of lipopolysaccharides (LPS). LPS are considered as very important elements for *Brucella* pathogenicity and immunogenicity. Furthermore, LPS appear a high similarity with those of *Yersinia* serotype O:9 which can reach 98% in their internal structure, mainly the O chain component, causing regularly serum cross reactivity and confusion in results reading and analysis.

Nanobody technology is considered as a recent molecular biology technique performed by means of the genetic engineering of special type of antibodies, existing exclusively in *Camelidea*. It enables the obtaining of small binders, referred to as Nanobodies (Nb). Nbs, characterized with their high stability and solubility, are produced by gene expression in *E. coli.* In fact, they are extracted form a gene library of a high diversity, from which active binders are isolated by panning with phage display. In the early steps of this procedure, Nanobodies are present as displayed molecules on the surface of phages, or Nanobody-displaying phages (Nb-phages).

In this work, a previously established Nb library, created from Arabian camel immunized with *B. melitensis* total antigens, was subjected to a subtractive panning with LPS from *Yersinia* followed with those from *Brucella*. This resulted in several Nb-phages able to distinguish between these two genera. Genes of selected Nbs were then recloned in protein expression plasmid in order to produce their pure recombinant proteins. Pure Nbs were able to distinguish efficiently between *Brucella* and *Yersinia* in form of LPS or intact bacteria, as demonstrated by Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (Elisa) and bacteria dot blot techniques. Results of this work could be invested in the development of precise and rapid diagnostic kits to discriminate between *Brucella* and *Yersinia* infections.

Keywords:
LPS, Brucella, Yersinia, Nanobody, Phage Display

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

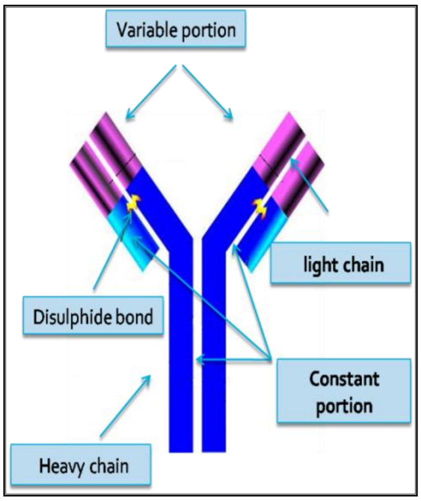
1. المقدمة:

1.1. جهاز المناعة: Immune system

جهاز المناعة منظومة من العمليات الحيوية التي تقوم بها أعضاء وخلايا وجسيمات داخل جسم المتعضيات بغرض حمايتها من الأمراض والسموم والخلايا السرطانية والجسيمات الغريبة. هذه المنظومة الحيوية تقوم بالتعرف على العوامل الممرضة وتحييدها أو إبادتها مميزة خلال ذلك بين هذه الممرضات وبين خلايا الجسم السليمة وأنسجته الحيوية ، فالجهاز المناعي يتركب من العديد من أنواع البروتينات والخلايا والأعضاء والأنسجة التي تتفاعل مع بعضها بطريقة ديناميكية متطورة عبر شبكة معقدة من الاتصالات. وكجزء من هذا التعقيد تطور جهاز المناعة مع مرور الزمن ليشمل ما يعرف بالمناعة المكتسبة والذاكرة المناعية والتي بفضلهما أصبح الجهاز المناعي لدى الإنسان يستطيع التعرف على عدد غير محصور من الجسيمات ويتعامل بكفاءة عالية مع مختلف الممرضات. ومن أهم أنواع الخلايا المسؤولة عن هذا النوع من المناعة هي الخلايا التائية والخلايا البائية.

2.1. الأضداد: Antibodies

تقوم الخلايا البائية بدور رئيسي يتمثل بإنتاج وإفراز بروتينات سكرية تعرف بالأضداد أو(غلوبولينات مناعية) وذلك بعد تحريضها بالمستضد antigen ويكون لهذه البروتينات القدرة على التفاعل النوعي مع هذا المستضد. تتألف الأضداد من أربع سلاسل عديدة الببتيد سلسلتين ثقيلين وسلسلتين خفيفتين، وترتبط السلاسل الأربعة بروابط ثنائية الكبريت. تقسم السلاسل الخفيفة والثقيلة إلى مناطق متغايرة ومناطق ثابتة، حيث تكون المناطق المتغايرة مسؤولة عن تشكيل الجيب الذي يربط المستضد النوعي أما المناطق الثابتة فتكون مسوؤلة عن وظائف حيوية متنوعة مثل تفعيل المتممة والارتباط بمستقبلات السطح الخلوي (الشكل1).



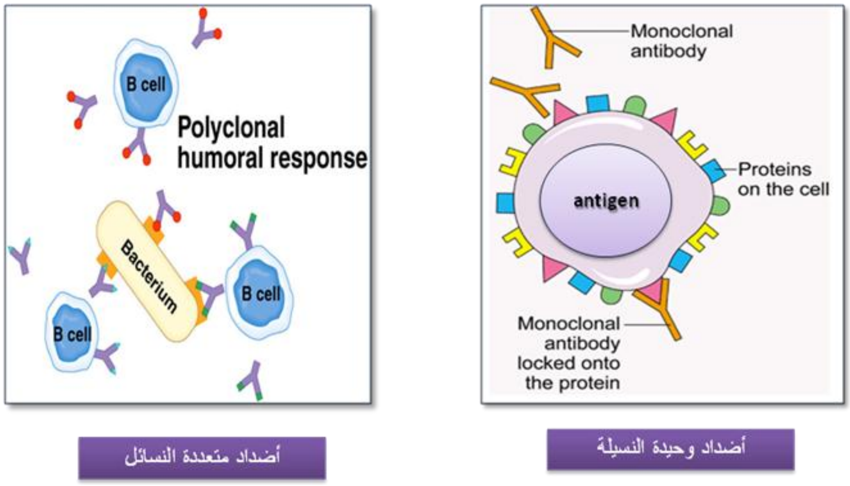
الشكل 1: البنية العامة للضد

يظهر الشكل بنية الضد، حيث يتألف من سلسلتين خفيفتين وسلسلتين ثقيلتين ترتبط فيما بينها بروابط ثنائية الكبريت، تتألف كل سلسلة من منطقة متغايرة ومنطقة ثابتة، يتكون الموقع الرابط للمستضد من المناطق المتغايرة لكل من السلسلتين الثقيلة والخفيفة في كل من ذراعي الضد حيث يعتبر الضد بمثابة جسيم رابط ثنائي التكافؤ لقدرته على ربط مستضدين في ذات الوقت.

تنتج الأضداد مخبرياً من خلال تحريض الجهاز المناعي لحيوانات المخبر (أرانب، فئران، جرذان وغيرها......) بالمستضد النقي على عدة جرعات باستخدام سواغات حيث يتم مراقبة تطور الاستجابة المناعية عندها، وعند استقرارها يتم الحصول على أحد نوعين من الأضداد:

أضداد متعددة النسيلة: polyclonal هي عبارة عن مزيج من الأضداد غير المتماثلة تنتج وتفرز من قبل عدة نسائل من الخلايا البائية البلازمية. يكون لهذا النوع من الأضداد القدرة على التعرف على معينات مستضدية مختلفة من سطح المستضد. تتصف بالطيف الواسع اتجاه المستضدات المتقاربة، حيث يمكن استعمال أمصال الحيوانات الممنعة مباشرة أو بعد إجراء عملية تنقية بسيطة وذلك للحصول على نتائج أفضل.

أضداد وحيدة النسيلة: Monoclonal وهي أضداد متماثلة تنتج من قبل نسيلة واحدة فقط من الخلايا البائية البلازمية المنتجة للأضداد والتي تتعرف على معينة مستضدية واحدة، تكون هذه الأضداد عالية النوعية تجاهها (الشكل 2). ولهذه الأضداد أهمية كبيرة نظراً لاستخدامها في الدراسات البحثية والعلمية ومعالجة العديد من الأمراض حيث لها العديد من التطبيقات. عملية إنتاجها تعتبر أكثر تعقيداً من النوع السابق حيث تنتج بصورة خاصة من الخلايا البائية للفئران وذلك بعد عملية شاقة من الاصطفاء للحصول على النسيلة البائية المحددة التي تنتج الأضداد النوعية للمستضد المدروس.



الشكل 2: أصناف الأضداد

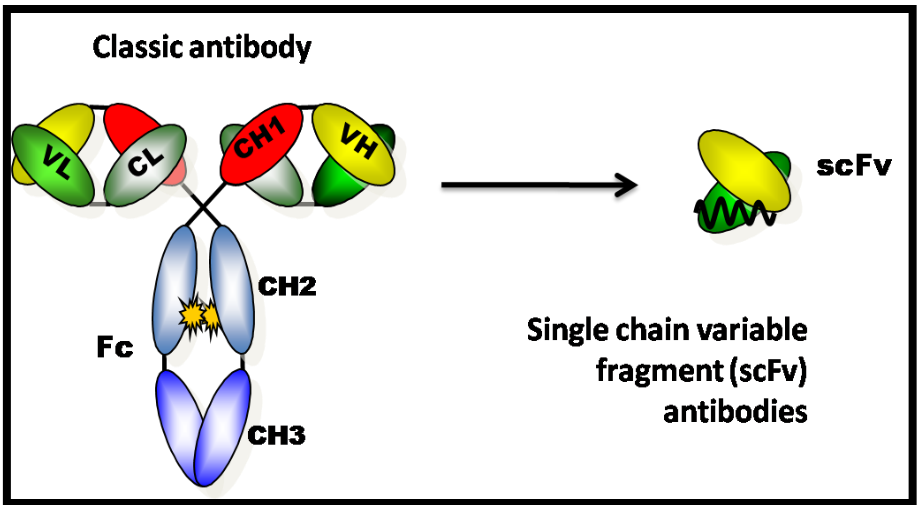
يوضح الشكل (يسار) الأضداد متعددة النسيلة التي تتعرف على أكثر من معينة مستضدية ،(يمين) الأضداد وحيدة النسيلة التي تتعرف على معينة مستضدية واحدة.

3.1. تطبيقات الأضداد وحيدة النسيلة:

إن الخاصية الفريدة التي تمتاز بها الأضداد من قدرتها على ربط مستضداتها النوعية بألفة عالية مكنت من استخدامها في العديد من التطبيقات الطبية والبحثية، حيث تعد الأضداد وحيدة النسيلة من أهم البروتينات المعروفة حالياً والتي يمكن استخدامها في تشخيص ومعالجة العديد من الأمراض مثل الروماتيزم (Feldmann & Maini, 2001) ومرض التصلب المتعدد (Doggrell, 2003) والعديد من السرطانات مثل سرطان القولون والمستقيم، سرطانات الرأس والرقبة وسرطان الثدي (Krueger *et al.*, 2007). بالإضافة لاستخداماتها البحثية، حيث تستخدم الأضداد في العديد من التطبيقات مثل تحديد هوية ومكان البروتينات داخل وخارج الخلية، وفي الترسيب المناعي Immunoprecipitation لفصل البروتينات عن أي شيء ملتصق بها من جزيئات أُخرى في الخلية (Brehm-Stecher & Johnson, 2004) وفي كيمياء الأنسجة المناعية Immunohistochemistry أوالفلورة المناعية Immunofluorescence ، ويتم أيضاً استخدامها في تحاليل التبصيم المناعي Western blot للتعرف على البروتينات المفصولة كهربائياً (Kurien & Scofield, 2006) كما يمكن أيضاً استخدامها في الكشف عن وجود المستضدات باستخدام تقنيات المقايسة المناعية الأنزيمية ELISA.

4.1. الهندسة الوراثية للأضداد المؤشبة:

على الرغم من كل هذه التطبيقات إلا أن هناك بعض المشاكل الحقيقية التي تواجه الباحثين والتي تنجم عن البنية المعقدة للضد بالإضافة إلى عدم ثباته وتخربه بدرجات الحرارة العادية وعدم تحمله درجات الحموضة، لذلك لجأ الباحثون إلى تبسيط بنية الضد من خلال الهندسة الوراثية للحصول على بروتين صغير حاوي على المنطقة الفعالة من الضد ويدعى هذا البروتين بـscFv (single-chain variable fragment) (الشكل 3) حيث يكون له القدرة على الارتباط بالمستضد بفاعلية كبيرة ولكن عملية إنتاجه تتطلب دمج مورثات المنطقة الفعالة من السلسلة الخفيفة و السلسلة الثقيلة بوجود رابط متعدد الببتيد وهذا أمرمعقد و صعب نسبياً (Serge Muyldermans *et al.*, 2009).



الشكل 3: هندسة الأضداد

يوضح الشكل إنتاج جزيئة scFv من الضد العادي باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية وذلك من خلال دمج مورثات المنطقة الفعالة من السلسلة الخفيفة والثقيلة مع وجود رابط متعدد الببتيد.

إن صعوبة إنتاج مثل هذا النوع من الأضداد المؤشبة يتمثل في مراحل العمل المخبري المعقدة، التي تتطلب العمل بصورة متوازية على مورثتين منفصلتين، ومن ثم عملية دمجهما برابط صنعي لا يضمن في أغلب الأحيان استقرار وانحلالية المنتج البروتيني النهائي (Saerens *et al.*, 2008).

لقد تبين وجود بديل بالطبيعة، حيث أن مصل الجمل يحوي نوعين من الأضداد، فبالإضافة إلى الأضداد التقليدية تبين وجود نوع أخر من الأضداد يفتقد السلسة الخفيفة ويحتوي فقط على السلسة الثقيلة، التي تؤدي مفردة ،الدور الأساسي للضد في ربط المستضد ولهذا يمكن إنتاج المنطقة الفعالة من هذا الضد بصورة تأشيبية بحيث نحصل على جسيم رابط مستقر البنية وعالي الإنحلالية يدعى بالضد النانوي.

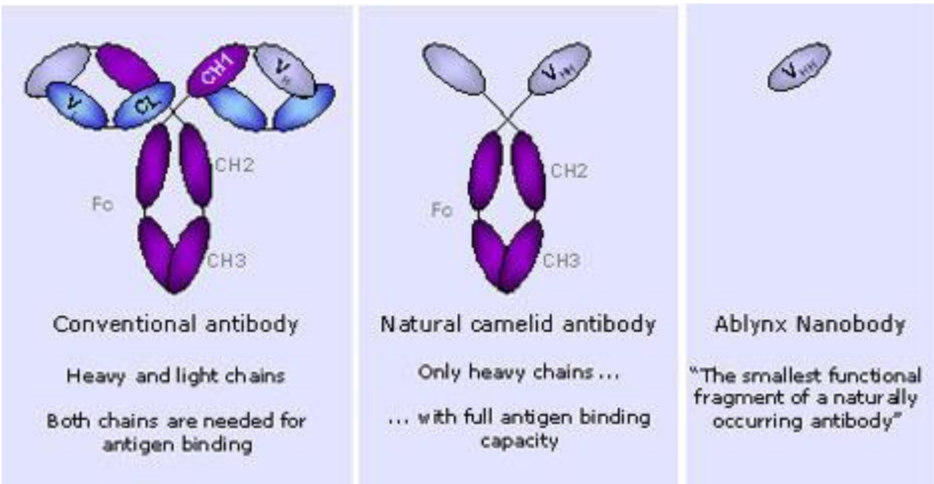
5.1. الأضداد النانوية Nanobodies:

1.5.1. لمحة تاريخية:

لاحظ مجموعة من الباحثين عام 1989 في الجامعة الحرة (بروكسل، بلجيكا)، في إحدى الاختبارات على مصل جمل، احتوائه على أضداد فريدة من نوعها تختلف عن الأضداد العادية في بنيتها حيث تفتقد هذه الأضداد السلسلة الخفيفة و تحتوي فقط على السلسلة الثقيلة .

بعد عدة سنوات من الأبحاث، نشر Hamers وزملائه اكتشافهم في مجلة Nature في عام 1993 (Hamers *et al.*,1993)، بأن عائلة الإبل (*Camelidea*) تتميز عن غيرها من الثدييات في أن نظامها المناعي قادر على تشكيل أضداد بسيطة البنية، تدعى بالأضداد ذات السلاسل الثقيلة (Heavy chain antibodies) إضافة إلى الأضداد العادية (Katja *et al.*, 2001). يتميز هذا النوع من الأضداد بفقدانه للسلسلة الخفيفة التي تمثل المكون الأساسي في بنية الضد العامة، وبذلك فهي تحتوي فقط على نوع متطور من السلاسل الثقيلة التي تؤمن عملية الارتباط بالمستضد بنفس قدرة الأضداد العادية.

لقد تمكن الباحثون باستخدام الهندسة الوراثية من عزل وإنتاج المنطقة الفعالة من السلسلة الثقيلة لهذه الأضداد والتي تدعى VHH أو الضد النانوي (الشكل 4). وهي عبارة عن بروتين صغير يبلغ 15 كيلودالتون وله القدرة الكاملة على الارتباط بمستضده النوعي (Desmyter *et al.*, 1996).



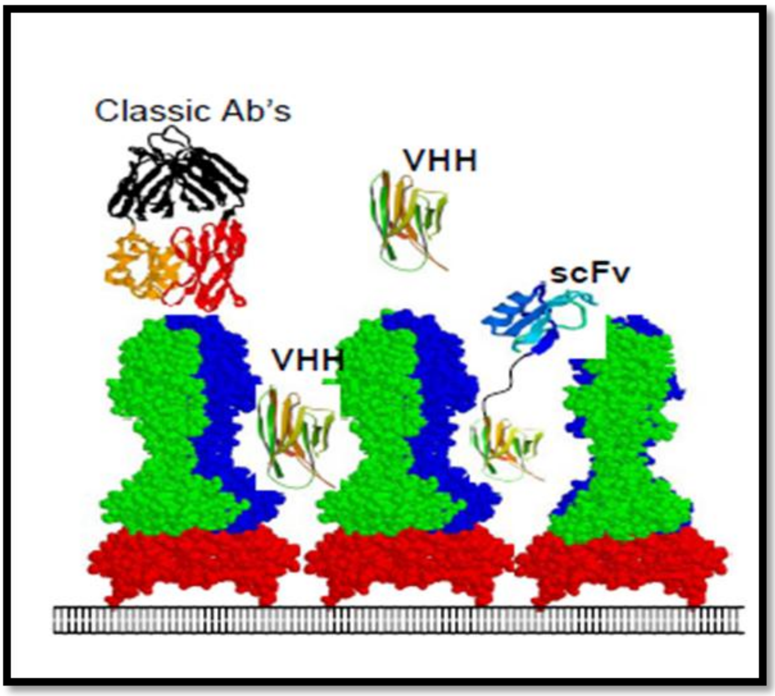
الشكل 4: مقارنة بين الأنواع المختلفة للأضداد عند الجمل العربي.

من اليسار يبين الشكل الأضداد التقليدية والتي تتركب من سلاسل ثقيلة وخفيفة. أما في الوسط الأضداد ذات السلسلة الثقيلة وهذه الأجسام تفتقد السلسلة الخفيفة وتملك فقط السلسلة الثقيلة التي تؤمن الارتباط بالمستضد، ومن اليمين الضد النانوي وهو المنطقة الفعالة من السلسلة الثقيلة والتي تدعى VHH والتي يتم إنتاجها بطرائق الهندسة الوراثية.

2.5.1. خصائص الأضداد النانوية:

تعد الأضداد النانوية من الأدوات الجزيئية الواعدة في العديد من التطبيقات التقنية البيولوجية والطبية. فالحجم الصغير الذي تمتاز به هذه الأضداد تعطيها القدرة على الالتحام بأهدافها فهي قادرة على الالتصاق بأهداف مخفية كما هي الحال بالنسبة للمواقع الفعالة للأنزيمات (active sites) أو الصدوع في الأغشية الخلوية الأمر الذي يستعصي في أغلب الأحيان على الأضداد العادية (De Genst *et al.*, 2006; Harmsen & De Haard, 2007).

وأيضاً تعد بنيتها الثابتة والبسيطة مصدر الكفاءة والأداء العالي الذي تمتاز به (الشكل 5). كما أن الأضداد النانوية يمكنها أن تحتفظ بفعاليتها حتى في الشروط الفيزيولوجية القاسية، فهي تبقى قادرة على الارتباط بالمستضد في الأوساط المرجعة التي تتواجد داخل الخلايا الحية. كما يمكنها أن تمر بسهولة عبر الأغشية الخلوية وتصل لكل خلايا الجسم. وتمتاز هذه الأضداد النانوية بأنها أكثر ثباتا في مقاومة درجة الحرارة وتغيرات درجة الحموضة، وتحتفظ بفاعليتها أثناء مرورها بالمعدة والأمعاء بعكس الأضداد العادية التي تتلف بالتغيرات الحرارية وبإنزيمات الجهاز الهضمي (Gao *et al.*, 2003).

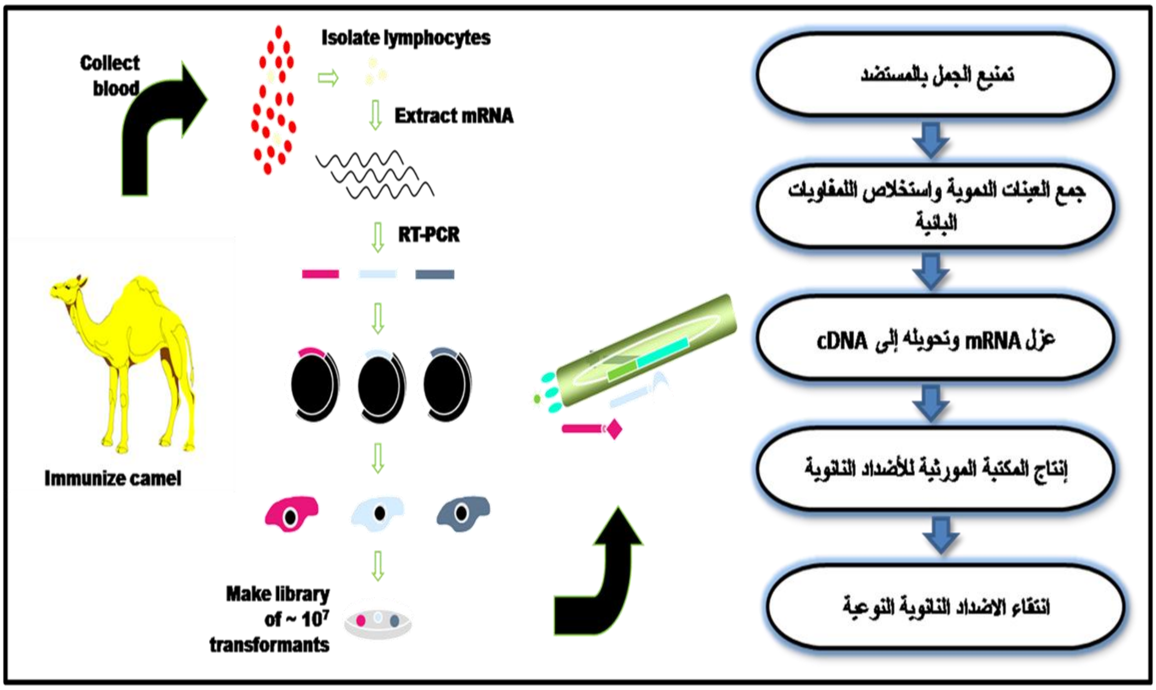


الشكل 5: نفاذية الأضداد النانوية

يوضح الشكل مقدرة الأضداد النانوية على اختراق الأماكن المخفية في بنية متعدد السكاريد اللبيدي بسبب صغر حجمها ومقدرتها على اختراق الأماكن المخفية الأمر الذي يستعصي على الأضداد العادية.

3.5.1. طريقة إنتاج الأضداد النانوية:

يتم إنتاج الأضداد النانوية من خلال سلسلة معقدة من الخطوات (الشكل 6)، تبدأ بعملية تمنيع الجمل بالمستضد، ثم جمع العينات الدموية واستخلاص اللمفاويات البائية، ثم عزل الرنا المرسال mRNA وتحويله إلى cDNA بعملية النسخ العكسي، بعد ذلك يتم تضخيم مورثات الأضداد النانوية باستخدام مرئسات Primer خاصة ثم تنسل شدف الـDNA المضخمة باستعمال تفاعل الالتحام Ligation مع البلازميد ومن ثم تُدخل التراكيب الجديدة إلى داخل البكتيريا للحصول على عدد كبير من المستعمرات البكتيرية التي بداخل كل منها أحد البلازميدات الحاوية على مورثة ضد من الأضداد النانوية وهو مايعرف بالمكتبة المورثية للأضداد النانوية وانطلاقا من هذه المكتبة يتم انتقاء الأضداد النانوية النوعية باستخدام تقنية الفاجات العارضة (Davis, 2000).



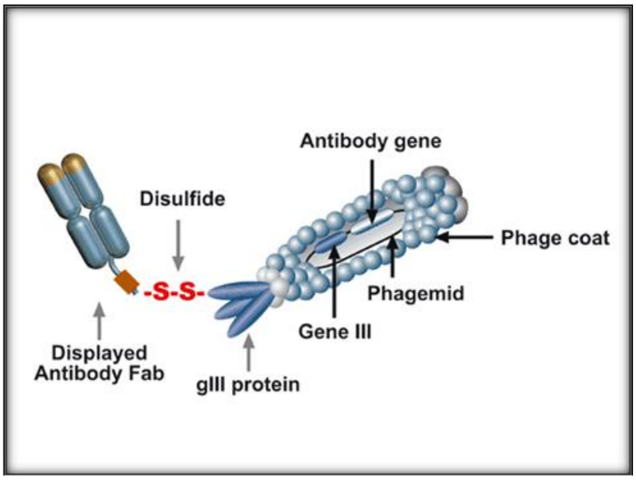
الشكل 6: مراحل انتاج المكتبة المورثية للاضداد النانوية

يوضح الشكل مراحل إنتاج المكتبة المورثية للأضداد النانوية والتي تبدأ بتمنيع الجمل، ومن ثم جمع العينات الدموية واستخلاص اللمفاويات البائية، ثم عملية عزل الـ mRNA وتحويله إلى cDNA وإنتاج المكتبة المورثية، ثم انتقاء الأضداد النانوية النوعية للمستضد المدروس بتقنية الفاجات العارضة.

4.5.1. الفاجات العارضة Phage display:

ملتهمات البكتيريا Bacteriophages هي أنواع من الفيروسات تتطفل إجباريا" على البكتيريا وتتكاثر بداخلها. ومن أهم أنواع الفاجات المستخدمة في هذه التقنية الفاج الخيطي M13 (McCafferty *et al.*, 1990). حيث يتميز بعدد من الخصائص التي تجعله هاماً في مجال الهندسة الوراثية حيث أنه من السهل عزله وإعادة إحداث العدوى، كما أن حمضه النووي يصبح مزدوج السلسلة بعد حصول العدوى.

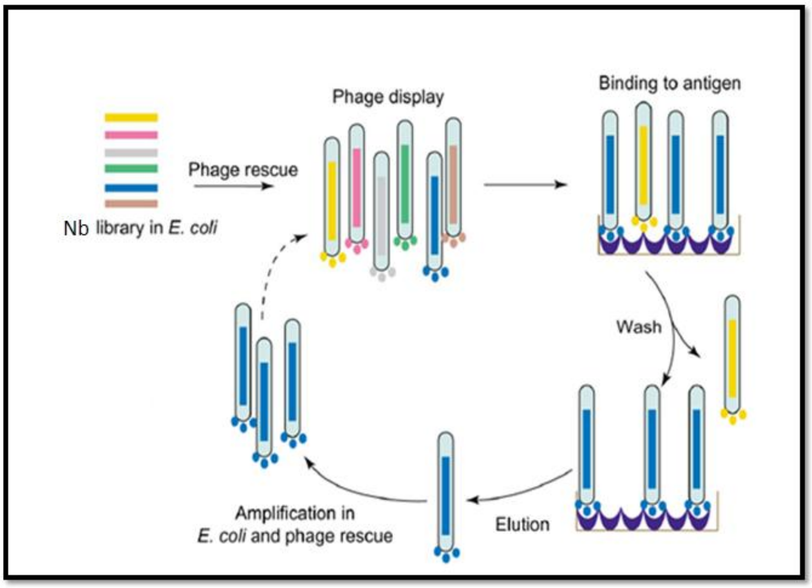
إن مبدأ تقنية الفاجات العارضة (الشكل 7) هو إدخال جزيئة الـ DNA المرمزة للبروتينات أو الببتيدات إلى جانب أحد مورثات المعطف (pVIII, pVI, pIII) وذلك في بلازميد التعبير البروتيني ومن ثم إدخال هذه البنية الى البكتيريا، بحيث ينتج عن تطفل الفاج عليها نوع محور من الفاجات التي تستخدم البروتين المدمج في بناء معطفها وبالتالي تعرض على سطحها البروتين المطلوب.



الشكل 7: شكل توضيحي للفاج العارض

يوضح الشكل البروتينات المعروضة على سطح الفاج، حيث يتم إدخال التسلسل النكليوتيدي المرمز للبروتين المطلوب إلى جانب مورثة المعطف ليتم عرضه على سطح الفاج.

بهذه الطريقة فإنه لدى تطفل الفاجات على مكتبة الأضداد النانوية البكتيرية نحصل على مكتبة جديدة من الفاجات العارضة على سطحها مختلف الأشكال الضدية التي تحتويها المكتبة البكتيرية. من هذه المكتبة الفاجية تتم عملية غربلة للأشكال الفعالة من الأضداد والنوعية للمستضد المدروس (الشكل 8).



الشكل 8: مبدأ تقنية الفاجات العارضة

يوضح الشكل تطفل الفاجات على المكتبة المورثية للأضداد النانوية والحصول على مكتبة فاجية جديدة عارضة على سطحها الأضداد النانوية. بعد ذلك تتم عملية ربط هذه الفاجات العارضة بالمستضد المدروس ثم عملية غسل للتخلص من الفاجات غير النوعية، ومن ثم عملية شطف وذلك لفك ارتباط الفاجات العارضة للأضداد النانوية النوعية عن المستضد. بعد ذلك إعادة عدوى هذه الفاجات المنتقاة في البكتيريا وذلك للحصول على عدد أكبر من الفاج العارض للضد النانوي النوعي.

إن تقنية الفاجات العارضة لها أهمية كبيرة حيث أنها تدرس تفاعل بروتين مع بروتين، بالإضافة إلى دورها في إنتاج الأضداد المؤشبة من خلال إنشاء المكتبة المورثية للأضداد داخل الفاج واستعراض مختلف للأضداد والتي من بينها النانوية بحيث تمكننا من مسح مكتبات ضدية ضخمة لانتقاء الأشكال الضدية العالية الألفة والنوعية نحو المستضدات المدروسة. كما تمكننا من عزل أشكال ضدية نوعية لمعينات مستضدية مشتركة عند عدد من المستضدات المختلفة أو بصورة معاكسة، تمكننا من عزل أشكال ضدية قادرة على التفريق بين المستضدات التي تبدي درجة عالية من التشابه فيما بينها لدى بعض النماذج الحيوانية (Winter *et al.*, 1994; Winter, 1998).

5.5.1. تطبيقات الأضداد النانوية:

حالياً بدأ استخدام هذه الأضداد في العديد من المجالات الحيوية الواسعة والمجالات الطبية حيث تستخدم كأداة تشخيصية وعلاجية. وهنالك توجه إلى الاستعاضة عن الأضداد التقليدية بهذا النوع الجديد من الأضداد نظراً لسهولة الاستنسال ووفرة الإنتاج. حيث عزلت أضداد نانوية قادرة على التعرف على أحد أنواع الديدان الشريطية (Saerens *et al.*, 2004)، وتمييزه عن نوع شبيه من نفس الجنس (Deckers *et al.*, 2009). كما عولج مرض النوم الذي يسببه طفيلي التريبانوزما بنجاح بالأضداد النانوية (Baral *et al.*, 2006). كما أثبتت فاعليتها في القضاء على الأورام السرطانية لدى الفئران حيث تلتصق بكفاءة عالية بجدار الخلية السرطانية (Cortez-Retamozo*et al.*, 2004) مثل سرطان البروستات (Saerens *et al.*, 2004).

كما أن هناك دراسات حول استخدامها في علاج مرض الأمعاء الالتهابي والزهايمر وأمراض القلب والأوعية الدموية (Revets *et al.*, 2005 ; Harmsen and De Haard, 2007) وأيضاً علاج مرض الروماتيزم (Maass *et al.*, 2007).

كمشروع أولي لإنتاج الأضداد النانوية في هيئة الطاقة الذرية، تم اختيار العمل على مستضدات بكتيريا البروسيلا لكونها المسبب الرئيسي لمرض الحمى المالطية، الذي يعد من الأمراض المزمنة التي تصيب الإنسان والحيوان مسببة الخسائر الاقتصادية الفادحة ضمن قطعان الماشية. إضافة إلى ذلك فإن دراسة هذا المرض يعتبر من الأبحاث الجارية في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في قسم التقانة الحيوية وبالتالي فهو يمثل مادة بحثية هامة ومتاحة في نفس الوقت، إن واحدة من الأفكار الجديدة والواعدة التي كانت في هذا المشروع منذ البداية، هو إنشاء مكتبة أضداد نانوية عامة لخلاصة معقدة من مستضدات البروسيلا، بحيث يتم منها تدريجيا إنتقاء الأشكال الرابطة النوعية لبعض المكونات المفردة من هذه الخلاصة، وبصورة تعكس في بعض الأحيان مدى تمثيل هذه المكونات ضمن الخلاصة، أي بتعبير آخر مدى استمناعية كل من هذه المكونات (قيد النشر Abbady).

لقد كانت فكرة هذا العمل باستخدام المكتبة العامة، يمكننا عزل بعض الأضداد النانوية القادرة على ربط أشكال مختلفة من مستضدات البروسيلا LPS باعتباره واحداً من أكثر مكونات البروسيلا استمناعية وتحفيزاً لتشكل الأضداد (قيد النشر Al Mariri). والتي يمكن استثمارها في تطوير طرائق تشخيصية وعلاجية ناجعة للبروسيلا.

6.1. داء البروسيلات:

يُعرف هذا المرض في الحيوانات باسم الإجهاض المُعدي، وفي الإنسان باسم الحمى المالطية Malta fever أو الحمى المتموجة Undulant fever. إن العامل المسبب لهذا المرض هو بكتيريا البروسيلا *Brucella* وسميت بذلك نسبة إلى أول من اكتشفها وهو David Bruce عام 1887م.

هو مرض حيواني بالدرجة الأولى ينتقل من الحيوانات إلى الإنسان و بسرعة تحت ظروف معينة و يصيب مجموعة من الحيوانات بدءاً من القوارض حتى وحيد القرن و الدلفين و الفقمة (Gonzalez *et al.*, 2002). يؤثر هذا الداء على الثروة الحيوانية التي تُعد من مصادر الدخل الرئيسية لمعظم الدول. يظهر هذا التأثير على الحيوان المُصاب بانخفاض إنتاجه للحليب والعقم والإجهاض إضافةً إلى تكلفة العلاج لحالات احتباس المشيمة والتهاب الضرع (Corbel, 1997).

1.6.1. العامل المسبب للمرض:

البروسيلا هي بكتريا مكورة عصوية صغيرة مفردة (من 0.5 إلى 0.7 ميكرومتر)، لها قدرة على الحركة بالرغم من عدم امتلاكها للسياط، وهي لا تمتلك محفظة خارجية، ولا تُشكل الأبواغ. والبروسيلا هي بكتريا سالبة الغرام لهذا لا تتلون بملون ستام Stamp (الشكل 9)، وهي هوائية اختيارية بعض السلالات تحتاج إلى 5–10% من غاز CO_2، تنمو بدرجات حرارة من 20 إلى 40 درجة مئوية، ودرجة حموضة pH المثلى: 6.6–7.4، لا تستخدم السيترات، ولا تُنتج الإيندول، تحتاج البروسيلا إلى الفيتامينات التالية: تيامين thiamine، نياسين niacine وبيوتين biotine (Plommet, 1991)كما أنها تحوي أنزيم الكاتالاز catalase وتُرجع النيترات إلى نيتريت. تظهر مستعمرات البروسيلا بعد 3–4 أيام من استنباتها على وسط Brucella agar، لكنها تظهر بعد 3–4 أسابيع من استنبات الدم لكن إضافة المصل لوسط الاستنبات يُحسن النمو. تكون المستعمرات صغيرة، دائرية، ملساء Smooth، أحياناً تكون خشنة Rough(Baldwin & Goenka, 2006)



الشكل 9: شكل عام للبروسيلا
صورة توضيحية تظهر الشكل الكروي العصوي للبروسيلا

وتعتبر البروسيلا من العوامل الممرضة المشتركة بين الإنسان والحيوان حيث تصيب العديد من الحيوانات البرية والأهلية. وهناك أربعة أنواع ممرضة للإنسان هي: البروسيلا المجهضة *B.abortus*، البروسيلا الضأنية *B.melitensis*، البروسيلا الخنزيرية *B.suis* والبروسيلا الكلبية *B.cani*. يمكن أن يعتبر تحديد نوع البروسيلا مؤشراً على طريقة العدوى (Al-Mariri *et al.*, 2002).

2.6.1. الوبائية:

تُعتبر الحمى المالطية من الأمراض المهنية، حيث يُشكل الاحتكاك المباشر بين الحيوانات الأهلية المصابة والمربين السبب الأول للعدوى، كما يُعتبر تناول الحليب الملوث ومنتجاته الطازجة من الأسباب الرئيسية للإصابة بالمرض(Galanakis *et al.*, 1996) كما يكون المختصين العلميين العاملين في مخابر متخصصة بالبروسيلا أيضاً عرضةً للإصابة المهنية (Zervos and Bostic, 1997) وقد تكون إصابتهم في

بعض الأحيان خطيرة. كما أن هناك احتمال انتقال البكتريا عبر الاتصال الجنسي (Wyatt, 1996). تنتقل العدوى للحيوان إما عن طريق التماس مع حيوان آخر مصاب أو تناول غذاء ملوث بالبكتريا، أو دخول البكتيريا عن طريق العين أو الجلد (Young, 2005)

3.6.1. الأعراض:

تختلف مدة الحضانة من 5 أيام إلى عدة شهور (أسبوعان في المتوسط)، وتختلف الأعراض خاصة في المراحل المبكرة للمرض (Boschiroli *et al.*, 2001) ، ويمكن أن تكون البداية مفاجئة وحادة مترافقة بقشعريرة وحمى وصداع شديد وآلام مختلفة وإحساس بتوعك وأحيانا يحدث الإسهال. ويمكن أن تبدأ أعراض المرض بالتدريج على هيئة توعك خفيف وآلام عضلية وصداع وألم خلف الرقبة مترافق بارتفاع الحرارة مساء. ومع تقدم المرض ترتفع الحرارة إلى 40 أو 41 درجة مئوية في المساء وتنخفض تدريجياً إلى المقدار الطبيعي أو القريب من الحرارة الطبيعية في الصباح، وعنها يحدث تعرق غزير. عادة تستمر الحرارة المتقطعة من أسبوع إلى 5 أسابيع يتبعها فترة من 2 إلى 14 يوم تخف فيها الأعراض كثيراً أو تزول ثم يعود الطور الحمي، وأحياناً يحدث هذا التطور مرة واحدة فقط وأحياناً أخرى يبدو المرض بشكل مزمن أو بشكل نوبات حمية متكررة (تموجات) مع فترات تحسن وذلك يحدث خلال أشهر أو سنوات عديدة .

يلاحظ بعد هذا الطور حدوث الإمساك بشكل واضح وأعراض أخرى مثل فقدان الشهية ونقص الوزن والألم البطني والألم المفصلي والصداع وآلام الظهر والضعف العام والأرق والاكتئاب. ويتضخم الطحال وقد تتضخم العقد اللمفية بشكل خفيف أو متوسط الشدة، أما الكبد فيتضخم في 50% من الحالات. ومن مضاعفات المرض النادرة التهاب الشغاف البكتيري تحت الحاد أو التهاب الدماغ أو التهاب الأعصاب أو التهاب المرارة أو التقيح الكبدي أو آفات في العظام. والإصابة المزمنة تطيل من الفترة اللازمة للشفاء ولكن الوفيات بسبب هذا المرض نادرة الحدوث (Corbel, 1997).

4.6.1. تشخيص البروسيلا:

تستخدم الطرائق الكلاسيكية لتشخيص البروسيلا عند الإنسان والحيوان، لكن هذه التحاليل تتميز بالنوعية و الحساسية الضعيفة نسبياً (الجدول 1)، ويمكن تطبيقها على المصل أو الحليب باستخدام مستحضر مستضدي من البروسيلا المجهضة المقتولة ويمكننا بهذه الطريقة كـــشف الأضداد الـمضادة للـ LPS (Al-Mariri *et al.*, 2002).

تختلف مدة وشدة الاستجابة الخلطية بعد الإصابة بالبروسيلا من شخص لآخر، ومن سلالة بكتيرية لأخرى، حيث لا نجد استجابة مصلية عند صغار الحيوانات، لأنها تكون سالبة التفاعل المصلي بعد الإجهاض. أما إصابة المضيف الحساس بسلالة شديدة الامراضية، فإنها تحرض تعداد ضدي عالي جدا. وبشكل عام يمكن كشف الـ IgM بعد الإصابة وتدوم طويلاً بعد اللقاح(Al-Mariri, 2008) .

الجدول 1. أهم الاختبارات المصلية لتشخيص البروسيلا

الأضداد التي يُكشف عنها	النوعية %	الحساسية %	التفاعل
IgM, IgG2, IgA	99.2	69	رايت
(IgG1, IgG2, (IgM	99.8	75	وردية بنغال
IgG1	99.9	79	تثبيت المتممة
(IgA, (IgG1	99.9	56	تفاعل حلقة الحليب
IgG1, IgG2	99.2	92.2	مقايسة مناعية أنزيمية

ومن الطرق المستخدمة في تشخيص البروسيلا:

- تفاعل رايت (Wright) أو تفاعل التراص: يكشف هذا التفاعل عن الـ IgM والـ IgG في المصل المدروس.
- تفاعل وردية بنغال (Rose Bengal): يستخدم للكشف السريع عن الإصابة في العينة المدروسة حيث يكشف IgM, IgG1, IgG2 .
- تفاعل Coombs: يعتمد على تثبيط الـ IgM في العينة المدروسة ولذلك فهو يكشف عن الـ IgG فقط.
- تفاعل تثبيت المتممة Complement Fixation test (CFT): يكشف هذا التفاعل عن وجود الـ IgG في المصل.
- تفاعل الحلقة Ring test (RT): لكشف أضداد IgA, IgG1 في عينة الحليب.
- المقايسة المناعية الأنزيمية: إن حساسية هذه الطريقة هي الأفضل بين الاختبارات السابقة، ولكنها غير قادرة على التميز الصحيح بين البروسيلا واليرسينيا المعوية ذات النمط المصلي O9 (*enterocolitica*,Y.O:9).

المقايسة المناعية الأنزيمية ضد LPS: إن المقايسة المناعية الأنزيمية غير مباشرة (iELISA) هي الأكثر استخداماً لكشف وجود أضداد ضد LPS في المصل. يتميز هذا الاختبار بأنهأكثر حساسية من التفاعلات السابقة، ولكنه ذو نوعية أقل بقليل منها، وهو أكثر نوعية لكشف البروسيلا بعد 3–4 أسابيع من الإصابة (Godfroid, 2002) ولكنه لا يستطيع تمييز الحيوانات المصابة عن الملقحة.

- يمكن إجراء اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية باستخدام بروتين كمستضد بدلاً من LPS لتشخيص المرض في الطور الحاد أو المزمن كما يمكن إجراء اختبار التبصيم المناعي الذي يسمح بتميز نــوعـــي للبروسيلا عن البــكتريا الأخــرى المــسببة للتفاعلات المــصلية الكاذبة الـموجبة (Al-Mariri *et al.*, 2001).

- يجب الإشارة إلى أنه لا يوجد حتى الآن إجماع دولي حول أي من الطرائق المصلية السابقة المعتمدة، فعلى سبيل المثال اعتمدت فرنسا اختبار وردية بنغال كاختبار لمسح البروسيلا، بينما اعتمدت الولايات المتحدة الأمريكية اختبار Coombs، أما بلجيكا اعتمدت اختبار رايت والتأكيد بتفاعل تثبيت المتممة (Godfroid, 2002).

معظم الأضداد التي يكشف عنها في التفاعلات السابقة هي ضد الـ LPS للبروسيلا، ولكن يجب الإشارة إلى وجود تشابه بالمحددات المستضدية للبروسيلا مع LPS بكتيريا أخرى مثل *Yersinia enterocolitica O:9* (Al-Mariri, 2008)، وبالتالي قد تكون هذه التفاعلات ايجابية مع بكتيريا غير البروسيلا فتسمى تفاعلات مصلية كاذبة. ولهذا يجب اللجوء للاختبارات التحسسية لإزالة هذا الالتباس، كما يمكن إجراء اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية ذو النوعية العالية. وهكذا لا يوجد حتى الآن اختبار مصلي يستطيع أن يؤكد 100% الإصابة بالبروسيلا .

5.6.1. اليرسينيا:

تُسبب بكتيريا اليرسينيا التهاب الأمعاء والقولون في الأغنام والماعز والأبقار، كما وتُسبب تسممات غذائية (التهاب معوي حاد وإسهالات) عند الإنسان وخاصة عند الأطفال. تتميز اليرسينيا بأنها عصيات مكورة، سلبية الغرام (الشكل10)، غير متحركة في الدرجة 37 مئوية، ومتحركة في الدرجة 25 مئوية بوساطة سياط محيطية (Bottone, 1999). تُقسم اليرسينيا إلى خمسة أنواع حيوية تبعاً لبنية السلسلة O في متعدد السكاريد الليبيدي (Bleves & Cornelis, 2000).



الشكل 10: شكل عام لليرسينيا
صورة توضيحية تظهر الشكل العصوي لليرسينيا.

7.1. متعدد السكاريد اللبيدي Lipopolysacharide (LPS):

1.7.1. تركيبه:

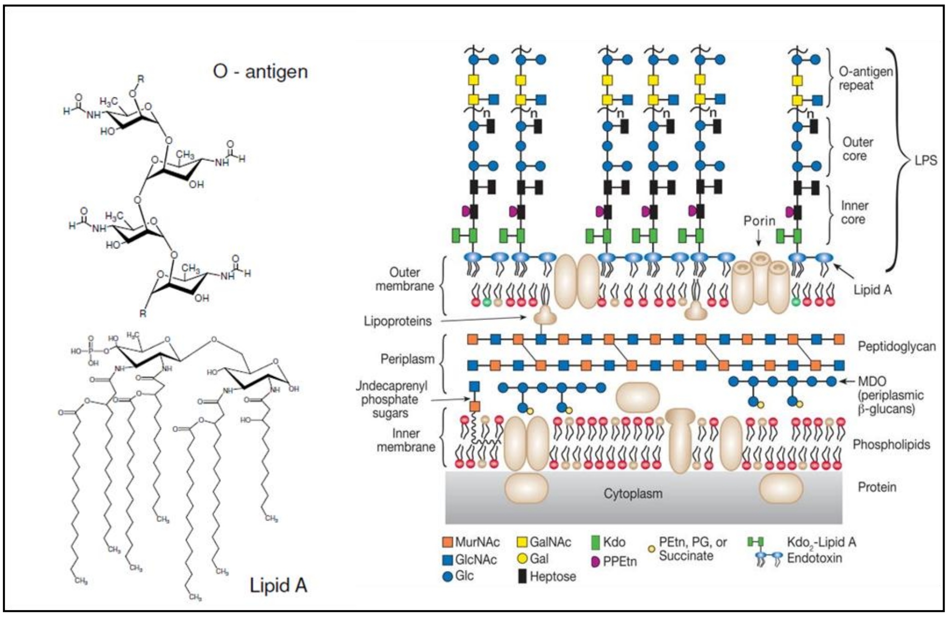
يشكل متعدد السكاريد اللبيدي LPS في الغشاء الخارجي من الجدار الخلوي للبكتيريا سالبة الغرام ما يعرف بالذيفان الداخلي (Endotoxin) ولقد سمي بهذا الاسم لأنه جزء صميمي من الجدار الخلوي

وذلك ما يعاكس حالة الذيفان الخارجي الذي يتحرر من الجرثوم وينطلق ليمارس تأثيراته المختلفة.

تمتلك البروسيلا متعدد السكاريد الليبيدي الـ LPS في غلافها الخارجي حيث يعتبر من أهم عوامل الفوعة لديها، حيث يساهم حيوياً في حماية بنية ووظيفة الغشاء الخارجي في البكتيريا ويعد عاملا أساسيا في تحفيز الجهاز المناعي على إنتاج الأضداد (Al-Mariri, 2010) .

يتكون من ثلاث وحدات مميزة:

- فوسفولبيد ويدعى بالليبد A: وهو المسؤول عن التأثيرات السمية ويتألف كيميائياً من 2,3 ثنائي الأمين، 2,3 ثنائي منزوع الاكسجين D غلكوز. نوع الروابط أمينية واستيرية ويتألف من حموض دسمة (Sergio *et al*,.2006).
- عديد السكاريد Oligosacharide: الذي يتكون من خمس سكاكر ترتبط عن طريق KDO (Ketodeoxyoctulonate) مع الليبدA. وهويتألف كيمائياً من 2 أمينو، 2,6 ثنائي منقوص الأكسجين D غلكوز 3 ثنائي منزوع الأكسجين D مانوز 2 حمض Octulosonic.
- المستضد O: يتألف من 1و2 روابط 4,6 ثنائي منزوع الاكسجين 4 فورم أميد α-D مانو بيرانوز. وهو المسؤول عن تحديد نوع المستعمرة فيما إذا كانت من الشكل الأملس أو الخشن حيث أن المستعمرة الملساء تحتوي على المستضد أما الخشنة فتفتقده (الشكل 11).



الشكل 11: التركيب الكيميائي لمتعدد السكاريد الليبيدي

يوضح الشكل التركيب الكيميائي لطبقة متعدد السكاريد الليبيدي حيث أنها تتألف من ثلاث طبقات طبقة المستضد Oوعديد السكاريد وطبقة الليبدA .

2.7.1. المشاكل التشخيصية:

لقد أظهرت الدراسات البنيوية والمناعية أنّ البروسيلا واليرسينيا المعوية ذات النمط المصلي O9 (YO:9)، يتشاركان في العديد من المعينات المستضدية العامة المنتشرة على السلسلة O التابعة لمتعدد السكاريد الليبيدي (Al-Mariri *et al.*, 2002)

أن نسبة الارتباط بين ثمالات السكاكر في السلسلة O للبروسيلا ذات النمط α-1,2 هي 98% بينما هي 100% لدى اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 ، لهذا حساسية الاختبارات المصلية المستخدمة حالياً لتشخيص البروسيلا لدى الحيوانات والإنسان تتراوح بين 56 و 79% فقط (الجدول 2).

الجدول 2: التشابه الكبير بين اليرسينيا والبروسيلا في متعدد السكاريد الليبيدي الموجود على سطح الغشاء.

البكتيريا	ثمالات السلسلة O	الارتباط بين السكاكر ضمن السلسلة O
B. abortus	4-formamido-4,6 dideoxy-α-D – mannopyranose	α-1,2(98%) α-1,3(2%)
Y.enterocolitica O:9	4-formamido-4,6 dideoxy-α-D – mannopyranose	α-1,2 (100%)

إن وجود مثل هذه التشابهات هو ما يسبب المشاكل أثناء القيام بالاختبارات التشخيصية، وهو ما يُظهر الحاجة الملحة للبحث عن أساليب بديلة عالية الحساسية والنوعية (Pappas *et al.*, 2005)، لعل من أهم هذه الأساليب هي تلك التي تعتمد طرائق البيولوجيا الجزيئية والتي تقوم على إنتاج أضداد تكون قادرة على الارتباط بصورة نوعية بمتعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا وتمييزه عن ذلك الخاص باليرسينيا ذات النمط المصلي O9 أو العكس (Hayhurst *et al.*, 2003; Laurent *et al.*, 2004).

أهداف البحث:

في ضوء المزايا العديدة لتقنية إنتاج الأضداد النانوية والتي يتم تطبيقها بنجاح في مخابر هيئة الطاقة الذرية فإن الغاية الأساسية للبحث ستكون عزل أضداد نانوية نوعية لمتعدد السكاريد الليبيدي البروسيلا بحيث تكون قادرة على تمييزها عن تلك الخاصة باليرسينيا (YO:9) وذلك على الرغم من التشابه الكبير بينهما. حيث ستكون بمثابة أدوات جديدة للتشخيص الصحيح والدقيق للإصابة بالبروسيلا بما يمكن اعتباره كخطوة أولى لإستراتيجية واعدة من أجل مكافحة مرض الحمى المالطية والقضاء عليه لدى قطعان الماشية.

الفصل الثاني

مواد وطرائق البحث

Materials and methods

2. مواد وطرائق البحث Material and Methods:

1.2. المرئسات والبلازميدات المستخدمة:

1.1.2. المرئسات المستخدمة:

استخدمت المرئستين الموجهة RP والعكسية GIII وأيضاً استخدمت المرئستين الموجهة RP والعكسية Fb، يوضح (الجدول 3) التسلسل النيكلوتيدي لهذه المرئسات.

الجدول 3: التسلسل النيكلونيدي للمرئسات المستخدمة

التسلسل النيكلوتيدي	الطول	الاسم
TCACACAGGAAACAGCTATGAC	22	**Rb**
CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	24	**Fb**
CCACAGACAGCCCTCATAG	19	**GIII**

2.1.2. البلازميدات المستخدمة:

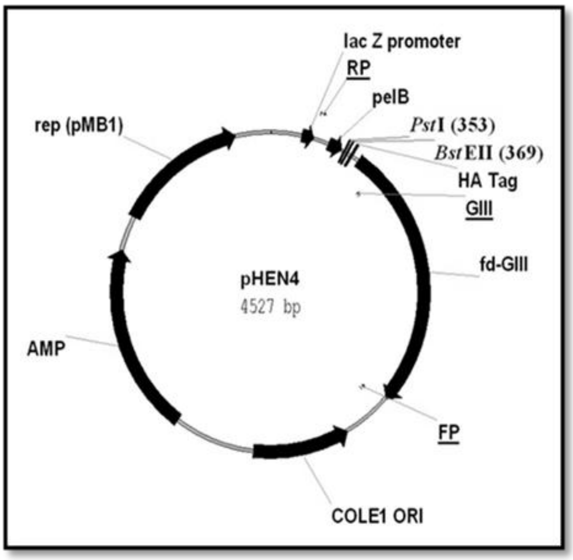
البلازميد pHEN4:

استخدام بلازميد التنسيل pHEN4 من أجل تنسيل مورثات الأضداد النانوية ضمن بكتيريا الـ *E.coli* TG1 (الشكل 12). من أهم الصفات التي يتميز بها هذا البلازميد:

مُحضض الـ Lac-Z: الذي يعمل ضمن البكتيريا ويحض على انتساخ المورثة.

تسلسل مورثة الغطاء GIII: والتي تساعد على عرض الضد النانوي على سطح الفاج M13.

واسمة HA: التي تقع بين مورثة الغطاء ومورثة الضد النانوي والتي تُساعد في كشف الضد النانوي باستخدام الضد النوعي للواسمة anti-HA في تقنيات المقايسة والتبصيم المناعيين.



الشكل 12: الخريطة المورثية للبلازميد pHEN4.

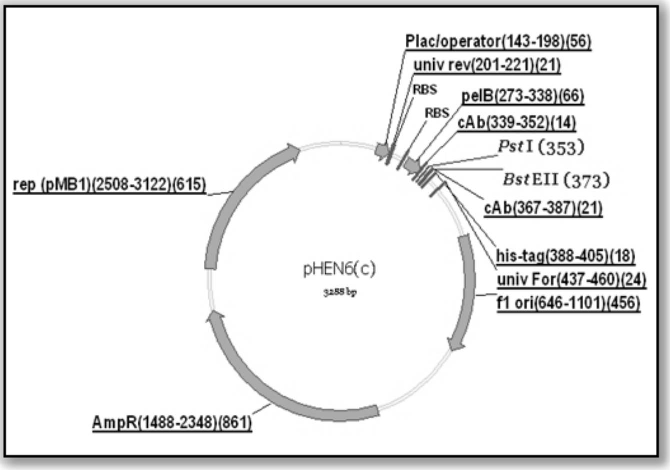
مخطط توضيحي يظهر الخريطة المورثية للبلازميد pHEN4 حيث نلاحظ موقع المحضض Lac–z والتسلسل الاشاري ولاحقة HA بالإضافة إلى موقع مورثة الغطاء GIII والمورثة المقاومة للأمبسيلين.

البلازميد pHEN6:

تم استخدام بلازميد pHEN6 وهو بلازميد مشتق من pHEN4 من أجل التنسيل والتعبير البروتيني لمورثات الأضداد النانوية ضمن بكتيريا الـ *E.coli* wk6 (الشكل 13). من أهم الصفات التي يتميز بها البلازميد:

مُحضض الـ P Lac: الذي يعمل ضمن البكتيريا ويحض على انتساخ المورثة.

واسمة الهيستيدين Histidine tag: تُساعد في تنقية البروتين المأشوب وكشفه بالضد النوعي للهسيتدين anti-His في تقنيات المقايسة والتبصيم المناعيين.



الشكل 13: الخريطة المورثية للبلازميد pHEN6.

مخطط توضيحي يظهر الخريطة المورثية للبلازميد pHEN6 حيث نلاحظ موقع المحضض PLac والتسلسل الاشاري ولاحقة الهسيتدين بالإضافة إلى موقع المورثة المقاومة للأمبسيلين.

2.2. الاستنبات البكتيري:

تم استخدام عدة سلالات من البروسيلا من نوع الضأنية، و من اليرسينيا،حيث يتم الاستنبات لكلا السلالتين على أطباق الزرع الصلبة 2YT (يحوي في كل ليتر 10 غرام Yeast Extract و16 غرام Trypton و5 غرام NaCl و15 غرام آغار بدرجة حموضة معتدلة) وبعد نمو المستعمرات، يتم تنميتها في دوارق الأوساط السائلة (Brucella broth + مصل الحصان) حيث تُحضن في شروطها المثلى للنمو من أجل الإكثار البكتيري في الدرجة 37 °م. وعند انتهاء فترة الحضن، تُرسب البكتيريا من الوسط السائل بالتثفيل (6000 دورة/دقيقة) ومن ثم تُغسل مرتين بالمحلول الملحي الفوسفاتي الـ PBS.

3.2. تحديد نقاوة السلالات البكتيرية باستخدام التفاعل السلسلي البوليميرازيPCR:

ُيعزل الـ DNA الجينومي من البكتيريا بطريقة CTAB/NaCl ويُحدد تركيزه بجهاز Nanodrop (Thermo®)، من أجل استخدامه في تفاعل Multiplex PCR الذي تمت أمثلته مسبقاً في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية بغرض التأكد من نقاوة السلالات المستخدمة.

1.3.2. استخلاص الـ DNA الجينومي بطريقة CTAB/NaCl:

المواد المستخدمة:

- TE buffer.
- 10 % (w/v) SDS
- 20 mg/ml proteinase K (stored at -20˚C).
- 5M NaCl.
- CTAB/NaCl solution (weight 4.1 g of NaCl in 70 ml H_2O then add 10 g CTAB slowly while heating and stirring, heat to 65˚C to dissolve if necessary, at the end adjust final volume to 100 ml by H_2O).
- 24:1 Chloroform/isoamyl alcohol.
- 25:24:1 Phenol/ Chloroform/isoamyl alcohol.
- Isoprobanol.
- 70 % Ethanol.

طريقة العمل :

- يُستنبت 5 مل من البكتيريا، ثم يُثفل 1.5 مل بالسرعة 14.500 rpm لمدة دقيقتين.
- يعاد تعليق الراسب بـ 567 µl موقي TE ويُمزج جيداً.
- يُضاف 30 µl من SDS % 10 ومن ثم يُضاف 3 µl من 20 mg/ml بروتيناز K، ويمزج جيداً ويُحضن لمدة ساعة بالدرجة 37 مع الرج.

- يُضاف 100µl من 5M NaCl ويمزج جيداً.
- يُضاف 80µl من محلول CTAB/NaCl، ويُحرك جيداً، ومن ثم يُحضن بالدرجة 65 °م مع الرج لمدة 10 دقائق.
- يُضاف حجم مماثل 780 µl من مزيج كلوروفورم/ ايزوايميل الكحول (1:24) ، ويمزج جيداً ثم يُثقل بالسرعة 14.500 rpm لمدة 4-5 دقائق.
- يُنقل الطور العلوي لأنبوب جديد ثم يُضاف حجم مماثل من مزيج فينول/ كلوروفورم / ايزوايميل الكحول(25:24:1) ، يمزج جيداً ثم يُثقل بالسرعة 14.500 rpm لمدة 5 دقائق.
- يُنقل الطور العلوي لأنبوب جديد ويُضاف 0.6 من الحجم من ايزوبروبانول ويمزج حتى يترسب الـ DNA، ثم يُثقل بالسرعة 14.500 rpm لمدة 5 دقائق.
- يُسكب الطور العلوي ومن ثم يٌغسل بـ 1مل من ايتانول % 70، ويمزج جيداً ثم يُثقل بالسرعة 14.500 rpm لمدة 5 دقائق
- يُسكب الطور العلوي و تُجفف العينة بجهاز التخلية (speed vac) (Eppendrof®). لمدة 10 دقائق.
- يُعاد تعليق الراسب بـ100µl من موقي TE.
- يُقرأ تركيز الـ DNA بواسطة جهاز المطيافية (Nanodrop)

2.3.2. تضخيم المورثات بوساطة التفاعل السلسلي البوليمرازي PCR.

تم تطوير تفاعل بلمرة من نوع خاص Multiplex PCR لاكتشاف DNA البروسيلا والبكتيريا باستخدام مزيج من البادئات وذلك بهدف الكشف عن سلالات البروسيلا بغية التحقق منها و التأكد من نقاوتها. يتم اللجوء إلى مثل هذا النوع من تفاعلات البلمرة بهدف اختصار الوقت وتوفير المواد والعينات.

<u>المواد المستخدمة:</u>

- 10x reaction buffer (200 mM Tris – HCl pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM $(NH4)_2SO_4$, 1µg/µl BSA, 1 % Triton).
- dNTPs mix (10 mM).
- Taq DNA polymerase (5u/µl).
- MgSO4 (50 mM).
- DNA template: 200 ng – 500 ng
- Primers (5 pmole/µl).

<u>طريقة العمل :</u>

- يضم أنبوب تفاعل الـ PCR (ذات السعة 200 µl) المكونات التالية الجدول 4.:

جدول 4: مكونات انبوب تفاعل الـ PCR

المواد	حجم التفاعل 25 µl	
بفر بتركيز 10x	µl	2.5
MgSo4 (50 mM)	µl	1.5
نكليوتيدات/dNTPs	µl	1
مزيج المرئسات (10 mM)	µl	2
عينة الـ DNA من البروسيلا واليرسينيا (200ng)	µl	2
أنزيم البوليميراز Taq	µl	0.2
ماء معقم مقطر ليصبح الحجم	µl	25

➢ توضع الأنابيب بجهاز الـ PCR ويُشغل الجهاز حسب البرنامج التالي الجدول 5.

جدول 5: برنامج جهاز الـPCR

البرنامج	درجة الحرارة	الزمن
البداية	95°م	3 Min
التمسيخ	94°م	30 Sec
التشافع	60	30 Sec
الاستطالة	72°م	45 Sec
دورة	35	Cycle
استطالة نهائية	72°م	10 Min

3.3.2. الرحلان الكهربائي للـ DNA على هُلامةالأغاروز:

بعد الانتهاء من عملية الـ PCR . تُحضر عينات الـDNA بإضافة موقي التهيئة ومن ثم ترحل عبر هُلامةالأغاروز % 1.5، حيث تنفصل شدف الـ DNA وفقاً لحجمها.

<u>المواد المستخدمة:</u>

- Agaros 15%
- TAE 50X buffer (Tris 2M –acetate 57.1 ml –EDTA10 mM)

- Ethidium Bromide (1mg/ml)
- Loding Buffer (6x) (xylene cyanol 0.10 %, bromophenyl blue 0.10% Glucerol 60 % , 50mM Tris HCl pH 7.6)

طريقة العمل :

- يُوزن 1.5غ من الأغاروز ويُكمل الحجم إلى 100 مل من موقي الرحلان 1X ويُسخن حتى الغليان.
- يُبرد المحلول للدرجة 50 -60°م ثم يُصب في قالب الهلامة.
- يُضاف نقطتين من الايتديوم برومايد الى محلول الأغاروز في القالب و يمزج المزيج جيداً ثم يُثبت المشط.
- تُترك الهُلامة لتتصلب لمدة 30 دقيقة.
- يُزال المشط، وتُنقل الهُلامة إلى جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي .
- يُضاف حجم معين من موقي الرحلان إلى جهاز الرحلان (يجب غمر الهُلامة).
- تُحضر العينات الناتجة من تفاعل الـ PCR حيث يضاف لكل عينة سدس حجمها من موقي تحضير العينات (بحدود 5 µl لكل انبوب) وتحرك جيداً.
- يُوضع 10 µl من واسمة عُصابة معيارية لسلم الـDNA الجزيئي (100bp).
- يشغل الجهاز بفولطية 85-100 ويترك لمدة 30- 60 دقيقة
- تُفحص الهُلامة باستعمال الأشعة فوق البنسفجية UV، حيث تظهر الأحماض النووية كحزم برتقالية يمكن تصويرها ودراستها.

4.2. عزل متعدد السكاريد اللبيدي LPS:

تم استخدام طريقة العزل بـ TRI Reagent وذلك لأنه يعمل على عزل متعدد السكاريد اللبيدي LPS بصورة نقية حيث ينقيه تماماً من البروتينات والـDNA والـRNA كما تمكن هذه الطريقة من الحصول على أكبر كمية من متعدد السكاريد اللبيدي من البكتيريا.

المواد المستخدمة:

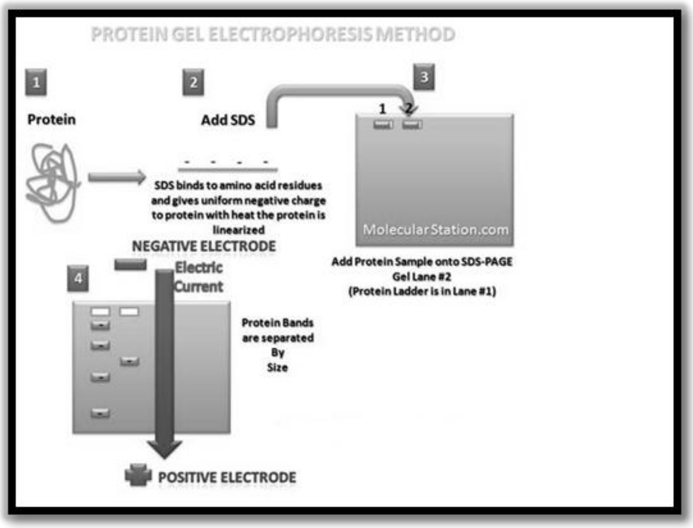
- TRI Reagent (aka = AGPC (Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform)
- PBS 1X
- 0.375 M magnesium chloride in 95% ethanol
- Chloroform
- .ddH_2O

طريقة العمل :

- تُثفل البكتيريا المغسولة بالـPBS سابقاً بسرعة 6000 rpm مدة 10 دقائق
- التخلص من الطور العلوي، يُعاد تعليق الراسب بـ 200 µl Tri-Reagent.
- يُحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.
- يُضاف 200 µl كلوروفورم من أجل الحصول على الطورين الطور المائي والطور العضوي وُيمزج جيداً.
- يُحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.
- يُثفل بالسرعة 12 000 rpm لمدة 10 دقائق.
- يُنقل الطور المائي إلى أنابيب جديدة و يُضاف 200 µl ddH_2O للطور العضوي ويُمزج جيداً.
- يُحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق ثم يُعاد التثفيل بالسرعة 12 000 rpm لمدة 10 دقائق.
- يُؤخذ الطور المائي مرة أخرى و تُعاد عملية الغسيل مرتين.
- يُجفف الطور المائي باستخدام جهاز التخلية speed vac .
- بعد التجفيف يُوضع 500 µl من (magnesium chloride in 95 % ethanol)
- يُعرض لجهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 15 ثانية.
- يُثفل بالسرعة 12 000 rpm لمدة 15 دقيقة.
- تُعاد عملية الغسيل والتعريض للأمواج فوق الصوتية ويُثفل مرتين.
- التخلص من الطور العلوي و التجفيف باستخدام جهازالتخلية speed vac .
- يُضاف 200 µl ddH_2O ويُمزج جيداً.
- يتم التأكد من نقاوة متعدد السكاريد اللبيدي بالرحلان الكهربائي على هلامة عديد الاكريلاميد والتلوين بصبغة الفضة Silver Staining.

1.4.2. الرحلان الكهربائي لمتعدد السكاريد اللبيدي:

تقنية جزيئية تستعمل لفصل البروتين وذلك تبعا لحجمه حيث يعمل الـ SDS تغيير البنية الثانوية للبروتين وتفكيكه الى ببتيدات وإعطاء شحنة سالبة للبروتين ويتم الترحيل عبر هلامة الاكريلاميد بتطبيق حقل كهربائي وتترحل البروتينات من القطب السالب إلى القطب االموجب حسب وزنها الجزيئي (الشكل 14)



الشكل 14: الرحلان الكهربائي للبروتينات

يوضح الشكل مبدأ هذه التقنية حيث يتم ترحيل البروتينات عبر هلامة متعدد الاكريلاميد من القطب السالب الى القطب الموجب وذلك حسب وزنها الجزيئي.

المواد المستخدمة:

جدول 6: المواد الداخلة في تركيب هلامة الفصل Separating gel وهلامة التكديس Stacking gel .

Solutions	Separating gel 12 % (15 ml)	Stacking gel 4 % (5 ml)
H_2O	1410 µl	2906 µl
30% Acrylamide (BioRad)	1458 µl	486 µl
1.5M Tris-Hcl. PH 8.8	1250 µl	-
0.5 M Tris-Hcl. PH 6.8	-	1260 µl
10% SDS	50 µl	50 µl
10% APS	25 µl	25 µl
TEMED	5.0 µl	5.0 µl

طريقة العمل :

- تُصب هلامة الفصل المكونة من المواد الموجودة في الجدول ثم يُضاف الايزوبروبانول الذي يعمل على تسوية سطح الهلامة وتترك حتى تتصلب.
- يُسكب الايزوبروبانول، ثم تضاف هلامة التكديس المكونة من المواد الموجودة في الجدول الثاني بعد وضع مادة TEMED 1 X ثم يتم وضع مشط مناسب وتترك الهلامة لتتصلب.
- بعد أن تتصلب الهلامة يتم غسل الآبار بالماء المقطر.

- تُنقل الهلامة الى حوض الترحيل ثم يضاف µl 25 من العينات الى كل بئر بواسطة ابرة هاملتون مع مراعاة غسل الابرة بعد اضافة كل عينة.
- يُوضع 5 من واسم الاوزان الجزيئية في البئر الاول .
- يُطبق حقل كهرائي جهده 80 فولط حتى تصل صبغة البروموفينول الى هلامة الفصل ثم ترفع الفولطية الى 150 وذلك لمدة ساعة ونصف تقريباً حتى وصول صبغة البروموفينول إلى أسفل الهلامة .
- تُلون الهلامة بصبغة الفضة.

2.4.2. التأكد من نقاوة عزل متعدد السكاريد اللبيدي باستخدام تقنية الصبغ بالفضة Silver Staining :

تعد هذه الطريقة من أكثر طرق التلوين دقة، حيث نستطيع من خلالها الكشف عن وجود بروتين ما مهما كان تركيزه منخفضاً، وبالتالي التأكد من نقاوة الـ LPS المعزول وعدم احتوائه على بقايا بروتينة، وذلك من خلال صبغ عصائب الـ LPS بنترات الفضة بعد ترحيلها عبر هلامة متعدد الأكريلاميد

المواد المستخدمة:

- محلول التثبيت (120 ml ايتانول +ml 30 حمض الخل +ml 150 ماء مقطر)
- محلول الحضن (ml ايتانول 100+ 21.7g اسيتات الصوديوم + 200ml ماء مقطر معقم ddH_2O. + clutaralaldahyed 807 µl +g 0.64 هيدروكسيد كبريتات الصوديوم)
- محلول الصبغ (g 3 .0 نترات الفضة +µl 100 الفورم الدهيد +300 ml ماء مقطر معقم ddH_2O)
- محلول الإظهار (7.5 g كربونات الصوديوم + 300 ml ماء مقطر معقم ddH_2O. +µl 60 الفورم الدهيد).
- محلول الإيقاف (EDTA 4.4 g+300 ml ماء مقطر معقم ddH_2O).

طريقة العمل :

- تُنقع هُلامة متعدد الأكريلاميد لمدة 30 دقيقة بمحلول التثبيت ثم يُحضن لمدة 30 دقيقة بمحلول الحضن.
- تُغسل بالماء ثلاث مرات لمدة 10 دقائق و تُحضن بمحلول صبغة الفضة لمدة 30 دقيقة.
- تُغسل بالماء ddH_2O ثلاث مرات لمدة دقيقة.

- تُحضن بمحلول الإظهار حتى ظهور العصابات حوالي 8 دقائق.
- يُوقف التفاعل بوضع الهُلامة بمحلول التوقف لمدة 10 دقائق.

3.4.2. تفاعل المقايسة المناعية للأضداد المنقاة من مصل الجمل على متعدد السكاريد اللبيدي:

<u>المواد المستخدمة:</u>

- T-PBS (Tween20- 0.05% in PBS 1X).
- Blocking buffer (skimmed milk 5% in PBS 1X).
- Antibody dilution buffer (Skimmed milk 2% in PBS 1X).
- TMB substrate (Tetramethylbenzidine and 0.02%, hydrogen peroxide).
- Stop solution (0.2N H_2SO_4).

<u>طريقة العمل :</u>

- تثبت المستضدات بتركيز µl / µg 1 في صفيحة 96 بئر وتحضن لمدة ساعتين في الحاضنة بالدرجة 37°م أو في البراد لليوم التالي.
- بعد عملية الحضن تسكب المستضدات من الصفيحة ويضاف µl 200 من موقي التغطية لكل بئر وتحضن الصفيحة لمدة ساعتين في الحاضنة بالدرجة 37°م.
- تغسل الصفيحة بموقي الغسيل T-PBS 5 مرات في غسالة الصفائح.
- يضاف µl 100 من IgG1, IgG2, IgG3 لكل بئر وتحضن الصفيحة لمدة ساعة في الحاضنة بالدرجة 37°م.
- تغسل الصفيحة بموقي الغسيل T-PBS 5 مرات في غسالة الصفائح.
- يضاف µl 100 من بتمديد Rabbit- anti- camel بتمديد1/3000 في موقي التمديد، وتحضن الصفيحة لمدة ساعة في الحاضنة بالدرجة 37°م.
- يضاف الضد الثانوي الموسوم Goat- anti- rabbit HRP بتمديد 1/3000 في موقي التمديد، ويحضن لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة.
- تُغسل الصفيحة بموقي الغسيل T-PBS 5 مرات بغسالة الصفائح ثم يضاف µl 50 من الركيزة TMB وتُحضن عدة دقائق في الظلام حتى ظهور اللون الأزرق.
- يُوقف التفاعل بإضافة µl 30 من 0.2 M H_2SO_4 لكل بئر كي يصبح اللون أصفر.
- تُقرأ الامتصاصية على طول موجة 450 nm بجهاز المطيافية وتحلل النتائج.

5.2. انتقاء الأضداد النوعية لمتعدد السكاريد اللبيدي LPS البروسيلا:

باستخدام تقنية الفيروسات العارضة Phage Display تم انتقاء الأشكال الضدية النوعية

للبروسيلا، حيث أن إضافة الفاجات (آكل البكتيريا M13) إلى مستعمرات المكتبة المورثية للأضداد النانوية يؤدي إلى إنتاج فاجات يعرض كل منها على سطحه واحداً من التراكيب البروتينية التي تحدده المستعمرة البكتيرية التي تطفل عليها، وبالتالي نحصل على تنوعية عالية من الفاجات (المكتبة الفاجية) التي يعرض كل منها على سطحه ضداً نانوياً ويحمل في داخله مورثة هذا الضد ضمن الفاجميد (pHEN4).

المواد المستخدمة:

- 100 mM $NaHCO_3$, pH 9.6
- LB (Luria-Bertani) medium
- 2 TY medium
- Ampicillin (100 µg/ mL)
- Kanamycine (70 µg/mL)
- Glucose 20%
- 100 mM triethylamine (pH ~10).
- 1 M Tris (pH 7.4).
- PEG/NaCl (20% PEG, 2.5 M NaCl)
- Litmus Milk (5%)
- PBS (0.05% Tween-20)
- PBS+ DMSO (7ml + 93ml PBS).
- 10^{12} p.f.u. M13K07 helper phage

1.5.2. تثبيت المستضدات ضمن أنابيب المقايسة المناعية:

طريقة العمل :

تُثبت مستضدات البروسيلا واليرسينيا ضم أنابيب المقايسة بتركيز µg / µl 1 في كربونات الصوديوم، وتحضن بالدرجة 37°م لليوم الثاني.

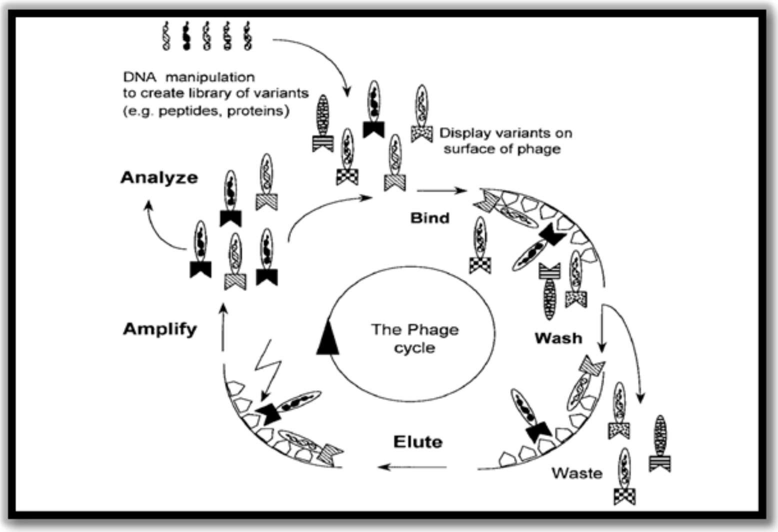
2.5.2. تحضير الفاجميدات: Preparation of phagemid:

طريقة العمل :

- يُستنبت 250 µL من مكتبة الأضداد النانوية في الوسط 2 TY الحاوي على امبسلين (100 µg/ml) وغلكوز 2%.
- تُحضن في الحاضنة بالدرجة 37°م لمدة 2− 3 ساعة مع الدوران 250-300 r.p.m.
- تُضاف 10^{12} من الفاجات Helper phage M13KO7 لإحداث العدوى (new England biolab®).
- تُحضن لمدة 30 دقيقة مع الدوران 250-300 r.p.m ثم 30 دقيقة بدون رج في درجة حرارة الغرفة.

- يُثقل بالسرعة .4,000 r.p.m لمدة 15 دقيقة.
- يُعاد تعليق الراسب بالوسط 2TY الحاوي امبسلين (100 µg/ mL) وكانامايسين (70 µg/mL).
- يُحضن لليوم الثاني بالحاضنة بدرجة حرارة 37°م مع الرج 250-300 r.p.m .
- يُثقل بالسرعة 4,000 r.p.m لمدة 30 دقيقة بالدرجة 4°م .
- يُنقل الطور العلوي لأنابيب جديدة ويُضاف PEG/NaCl 50 ml و يُحضن بالثلج لمدة ساعة.
- يُثقل بالسرعة 4000 r.p.m لمدة 30 دقيقة.
- التخلص من الطور العلوي ويُعاد تعليق الراسب بـ (PBS+ DMSO 7) 1 mL .
- يُنقل لأنابيب 1.5 مل من ثم يثقل مدة 5 دقائق بأقصى سرعة.
- يُقاس تركيز المكتبة الفاجية على طول موجة 260 nm.

3.5.2 . الغربلة Panning:



الشكل 15: مبدأ عملية الغربلة

يوضح الشكل إدخال جزيئة الـ DNA المرمزة للأضداد النانوية ضمن الفاج، والحصول على المكتبة المورثية للأضداد النانوية، ثم تعريض هذه الفاجات العارضة على مستضدات البروسيلا LPS و انتقاء الفاجات العارضة للأضداد النانوية النوعية لـ LPS البروسيلا. ثم التخلص من الفاجات غير النوعية وذلك بعملية الغسل. بعد ذلك تتم عملية شطف حيث يتم بذلك فك ارتباط الفاجات العارضة للأضداد النوعية عن المستضدات.

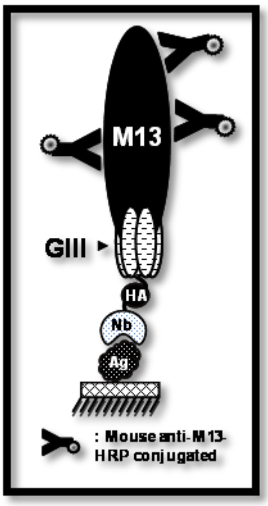
<u>طريقة العمل :</u>

- في بداية اليوم تُحضن مستعمرة واحدة من *E.coli* TG1 في 10 mL LB بالدرجة 37°م مع الرج - .250- 300 r.p.m

- يُضاف 200µl من (5%) Litmus Milk لأنابيب المقايسة، وتُحضن مدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.
- تُغسل الصفيحة 5 مرات بـ PBS ثم تُضاف الفاجات بتعداد 10^{11} و تُحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- تُغسل 5 مرات بالـ PBS
- يُفك ارتباط الأضداد النانوية النوعية بالمستضدات بإضافة 100 µL triethylamine.
- تُحضن لمدة 10دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم تُنقل إلى أنابيب جديدة. ويُضاف 100 µL Tris لتعديل الوسط.
- تُنقل الـ eluted phages إلى أنابيب جديدة وإضافة 300 µl من محلول 1M Tris لتعديل الوسط، ومن ثم استخدامه في إصابة خلايا بكتيرية جديدة (TG1) لتكون قاعدة انطلاق لدورة جديدة من عملية الغربلة بذات المستضد أو باستخدام مستضدات جديدة (شكل 15).
- تُخفف الـ eluted phages بنسبة 1/10 باستخدام PBS 1X.
- يُضاف 10µL من الفاجات المخففة و90µL من خلايا *E.coli* TG1 إلى صفيحة 96 بئر للحصول على التخفيفات 10^3 و10^4 و10^5 و10^6.
- تُحضن الصفيحة لمدة 2–3 ساعات وبالدرجة 37°م بدون رج.
- تُستنبت تخفيفات البكتيريا على وسط LB أغار حاوي امبسيلين (100 µg/ml) وغلوكوز% 2. تحضن لمدة 16 ساعة بالدرجة 37°م، ثم اختبار المستعمرات البكتيرية الناتجة بتفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية على مستضدات البروسيلا واليرسينيا المثبتة.

4.5.2. المقايسة المناعية الانزيمية للفاجات العارضة:

يعتمد مبدأ هذه التقنية على إنتاج الأضداد النانوية على شكل بروتينات معروضة على سطح الفاجات. ومن ثم التحقق من حدوث الارتباط بين الضد النانوي المعروض والمستضد المثبت باستخدام الضد النوعي للفاج الموسوم بالبيروكسيداز (Anti-M13 HRP) (الشكل 16).



الشكل 16 : شكل تمثيلي يوضح بنية الفاج العارض للضد النانوي

يوضح الشكل بنية الفاج العارض للضد النانوي ، حيث يكون الضد النانوي مرتبط بالبروتين (GIII) الذي يعتبر واحد من المكونات الأساسية لغلاف الفاج. يمكن الكشف عن هذه البنية المعقدة بعد ارتباطها بالمستضدات المثبتة، من خلال الضد النانوي، وذلك باستخدام ضد الفاج الموسوم بالبيروكسيداز (Anti–M13 HRP).

المواد المستخدمة:

- 100 mM $NaHCO_3$, pH 9.6.
- ampicillin 100 µg/mL.
- Glucose 20%.
- skimmed milk powder 5% (w/v) in PBS.
- PBS (0.05% Tween-20).
- TMB (Tetra Methyl Benzidine) (SIGMA®).
- 1M H_2SO_4.

طريقة العمل :

- تُثبت مستضدات البروسيلا واليرسينيا ضمن صفيحة 96 بئر بتركيز 1µgl/ µl وتُحضن في الدرجة 4°م لليوم التالي.
- تُستنبت المستعمرات في الوسط 2TY الحاوي على امبسلين (100 µg/ml) وغلـكوز (2 %) في صفيحة 24 بئر.
- تُحضن في الحاضنة بدرجة 37° م لمدة 3–4 ساعات حتى يتعكر الوسط مع الرج 250-300 r.p.m.
- يُضاف لكل بئر 10 µL من 10^{12} p.f.u. M13K07 helper phage.

- يُحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة بدون رج. ثم يتم الحضن في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة مع الرج 150 r.p.m.
- يُثقل بالسرعة 14000 r.p.m لمدة 15 دقيقة.
- يُعاد تعليق الخلايا بالوسط 2TY الحاوي على امبسلين 100 µg/ml ويُحضن لليوم الثاني بالحاضنة بالدرجة37°م .

اليوم الثاني:

- يُضاف 200 µl من skimmed milk 5% لصفيحة الـ ELISA وتُحضن مدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.
- تُغسل الصفيحة خمس مرات بـ PBS.
- بالعودة لصفيحة 24 بئر يضاف لكل بئر 200 µl من skimmed milk 5% وتُثقل بالسرعة 35000 r.p.m لمدة 15 دقيقة.
- يُضاف 200 µL من طافي المستعمرات الى صفيحة 96 بئر وتُحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- تُغسل الصفيحة 5 مرات بالـ PBS.
- يُضاف 100 µl من Anti-M13 HRP الموسوم بالبيروكسيداز، ومن ثم تُحضن الصفيحة مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- تُغسل 5 مرات بالـ PBS.
- يُضاف 50 µL من كاشفTMB لكل بئر ويُحضن بالظلام لمدة 10 دقائق حتى يظهر اللون الأزرق بشكل جيد.
- يُوقف التفاعل بإضافة 30 µl H_2SO_4 لكل بئر لظهور اللون الأصفر.
- تُقرأ الامتصاصية على طول موجة 450 nm وتُحلل النتائج.

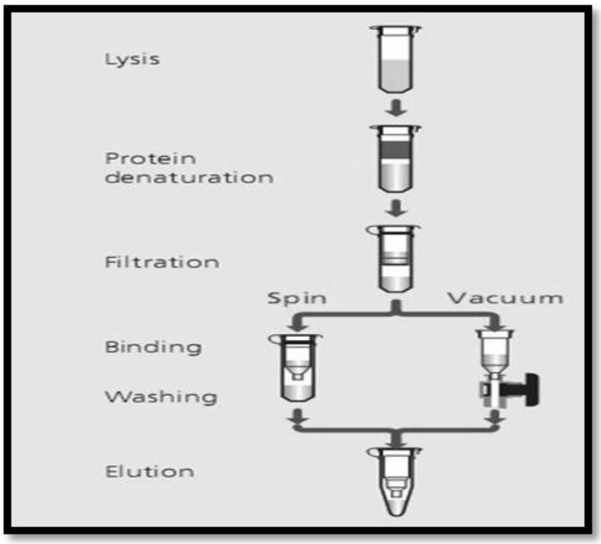
5.5.2. اختبار مورثات الاضداد النانوية بتفاعل الـ PCR:

تم التأكد من صحة أطوال هذه المورثات بإجراء تفاعل PCR باستخدام مرئسين (الموجهة RP والعكسية GIII). للتأكد من أن مورثات الأضداد النانوية من هذه المستعمرات ليست مجرد تكرارية لنفس التسلسل النكليوتيدي وإنما هي عبارة عن مورثات مختلفة قمنا بإجراء تفاعل قطع باستخدام أنزيم التقييد (HinfI) الذي يقطع في أماكن مختلفة على كل من شدف الدنا الناتجة والترحيل على هُلامةالاغاروز 2%.

6.2. إعادة تنسيل الاضداد النانوية في بلاسميد التعبير البروتيني:

1.6.2. اجراء عزل للبلاسميد بطريقة Mini prep:

تم عزل الفاجميد الحاوي على مورثات الأضداد النانوية المنتقاة من معلق الخلايا البكتيرية باستخدم طاقم(Bio Rad Aruum Plasmid Mini Kit Protocol) وبالتالي يتم الحصول على الفاجميد وبداخله مورثة الضد النانوي (الشكل 17).



الشكل 17: خطوات اجراء عملية عزل البلاسميد الحاوي على الأضداد النانوية

يلاحظ من الشكل خطوات عملية عزل البلاسميد من البكتيريا حيث يتم اضافة محلول الحل، ثم بعد ذلك محلول التمسيخ، ومن ثم اجراء عملية فلترة للحصول على البلازميد نقي.

<u>المواد المستخدمة:</u>

- LB (Luria-Bertani) medium**.**
- Ampicillin 100 µg/mL
- Resuspension solution**: (**50Mm Tris HCl (pH 8), 10Mm EDTA, 100Mg RNAase).
- Lysis solution**: (**NaOH 200 mM, SDS 1%).
- Neutralization solution**: (**KAC 2.55 mM adjust pH to 4.8 by Asetic Acid).

<u>طريقة العمل:</u>

- يُستنبت 1-5 مل من البكتيريا وتُحضن لليوم الثاني.
- تُثفل البكتيريا بالسرعة14000 r.p.m مدة 5 دقائق.
- يُضاف 250 µl Resuspension solution ويمزج الانبوب.
- يُضاف 250 µl lysis solution وإجراء تقليب للأنبوب ست مرات بهدوء.
- يُضاف 350 µl neutralization solution وإجراء تقليب للأنبوب ست مرات بهدوء.

- يُثقل بالسرعة 14000 r.p.m مدة 5 دقائق.
- يُنقل الطور العلوي لأعمدة الترشيح mini spin/vac colum.
- يُثقل 1 دقيقة والتخلص من الراشح.
- يُضاف 750 µl من محلول الغسيل ويُثقل مدة دقيقة.
- يُثقل مدة دقيقة للتخلص من آثار محلول االغسيل.
- نقل أعمدة الترشيح لأنابيب جديدة ونظيفة.
- يُضاف 50 µl محلول elution، وثم انتظار مدة دقيقة ثم يُثقل مدة دقيقة.
- يُقاس تركيز الـ DNA ويحفظ في الدرجة 4°م.

2.6.2. قطع مورثة الضد النانوي والبلازميد بأنزيمات التقييد:

تتم في هذه المرحلة قطع مورثة الضد النانوي من البلازميد pHEN4 بأنزيمات التقييد الـ BstEII والـ PstI (® Fermentaze) كما يتم معاملة البلازميد pHEN6 بنفس الانزيمات وذلك من أجل عملية التنسيل.

طريقة العمل :

- يتم إضافة المكونات التالية بعد اختيار الموقي اللازم لعمل الأنزيمين وذلك من أجل قطع 1 µg من الـDNA حسب الجدول 7:

جدول 7: المكونات الداخلة في عملية القطع.

موقي الانزيم	1µl	10x stock
أنزيم PstI	1 µl	10 u/ µl
أنزيمBstEII	1 µl	10 u/ µl
DNA(plasmidic/genomic)	1 µg	
ماء مقطر معقم	To 10 µl final volume	

- يُحضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 37°م لمدة 2 – 4 ساعات.
- يُرحل على هُلامة الأغاروز.

3.6.2. تنقية مورثات الأضداد النانوية من الجيل باستخدام Promega Kit:

بعد ترحيل ناتج القطع يتم تنقية الشدف من الهلامة باستخدام طاقم (® Promega Wizadr) SV Gel and PCR clean-up system

- تُقص الهلامة الحاوية على شدف الـ DNA المرغوبة بعد الرحلان الكهربائي وتُوضع في أنبوب إيبندورف.
- يُحسب وزن قطعة الهُلامة الحاوية على الشدفة من خلال حساب وزن الأنبوب الفارغ والحاوي على الشدفة.
- يُضاف ثلاثة أحجام من محلول الـBinding Buffer إلى وزن واحد من الهُلامة (300 µl من الـ Binding Buffer لكل 100 mg من الهلامة).
- تُوضع الأنابيب في حمام مائي بالدرجة 60°م حتى تذوب الهُلامة ثم تمرر العينة على أعمدة الترشيح وتُحضن لمدة دقيقة.
- تُثقل بالسرعة 14500 rpm مدة دقيقة، ثم التخلص من الراشح.
- يُضافµl 700 من محلول الغسيل وتُثقل بسرعة 14500 rpm مدة دقيقة ثم التخلص من الراشح.
- يُضاف µl 500 من محلول الغسيل ثم التثقيل مدة 5 دقائق و التخلص من الراشح.
- تُنقل أعمدة الترشيح إلى أنابيب جديدة ونظيفة.
- يُضاف µl 30 ماء مقطر، الانتظار مدة دقيقة ثم التثقيل بالسرعة 14500 rpm مدة دقيقة.
- يُقاس تركيز الـ DNA ويحفظ في الدرجة 4°م.

4.6.2. تفاعل ربط المورثة إلى البلازميد: Ligation Reaction

يتم ربط مورثة الضد النانوي بعد تنقيتها إلى الفاجميد (pHEN6) بوساطة أنزيم الربط ligase T4 الذي يقوم بلحم النهايات المتطابقة لكل من المورثة والفاجميد اللذان تم تقطيعهما بنفس أنزيمات التقييد.

المواد المستخدمة:

- 5 u /µl ligase T4
- Ligase buffer (10 X): (400 mM Tris - HCl pH 7.8, 100 mM $MgCl_2$)

طريقة العمل :

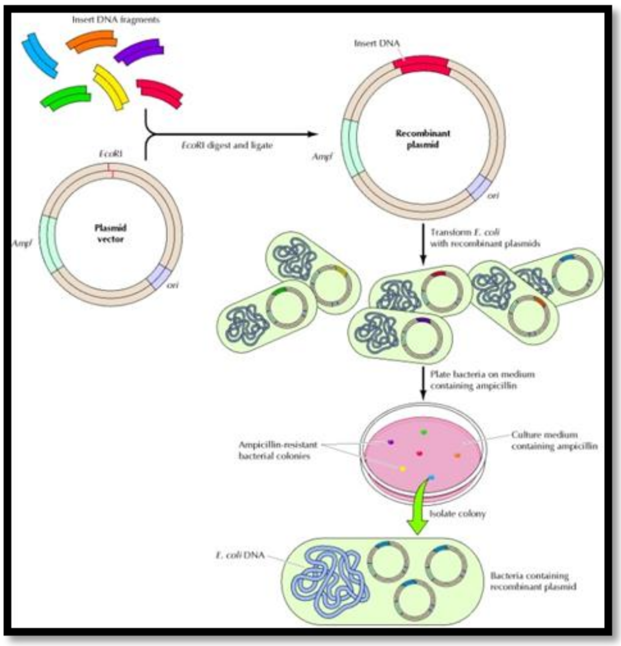
- حساب الكمية المطلوبة (ng) من شدفة المورثة المقطوعة (insert) للحمها بالبلازميد المقطوع (vector) المستخدم بكمية (50 ng) في التفاعل بحيث يتحقق التناسب بينهما (ratio) بمقدار (1:3)، ويتم ذلك وفق المعادلة:

$$\text{Insert of ng} = \frac{\text{50ng of vector} \times \text{Kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{molar ratio of } \frac{\text{insert}}{\text{vector}}$$

- إدخال التركيز المناسب لكل من المورثة والبلاسميد في تفاعل الربط ligation reaction
- يُضاف 5 u/ µl من أنزيم الربط ligase T4 إلى المزيج.
- يُضاف 1 µl من محلول Ligase buffer 10 X.
- يُكمل حجم المزيج إلى 10 µl من الماء المقطر.
- يُحضن المزيج في حمام مائي درجة حرارة 16 ْم ولمدة ست عشرة ساعة (overnight).
- يُثبط أنزيم الربط من خلال حضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 65 ْم ولمدة 10 دقائق.

7.2. التحوير البكتيري: Transformation

تم إدخال تفاعل ربط المورثة – البلازميد Ligation reaction إلى خلايا الـ *E.coli*, wk6 المهيئة لاستقبال البلازميد وذلك من اجل التعبير البروتيني (الشكل 18).



الشكل 18: تنسيل مورثة الضد النانوي والتعبير عنها في خلايا E.coli wk6.

مخطط توضيحي يبين عمليات تنسيل المورثة ضمن البلازميد، يتم إجراء عملية ربط للمورثة والبلازميد، بعد ذلك يتم إدخال نواتج تفاعل ربط بلازميد – مورثة للبكتيريا وزراعة المستعمرات البكتيرية على أوساط انتقائية.

1.7.2. تهيئة الخلايا البكتيرية: Electrocompetent cells

قبل عملية إدخال بلازميد التعبير البروتينيpHEN6 الحاوي على مورثة الضد النانوي، لابد من تهيئة الخلايا وجعل جدرانها نفوذة لاستقباله.

<u>المواد المستخدمة:</u>

- 1 mM Hepes pH 7: (58 mg from Hyroxy ethyl piperazine ethane sulfuric acid

in L H_2O).

- 10% glycerol (2 litre per litre culture) (Duchefa Biochemie

طريقة العمل

- تُستنبت مستعمرة من *E.coli* wk6 في 10 مل LB وتُحضن مدة 16 ساعة بالدرجة 37ْ م.
- يُضاف 1 مل من المستعمرة في 250 مل 2YT ويُحضن بالدرجة 37ْم مدة 2 ساعة حتى تصبح الكثافة الضوئية: OD_{600} = 0.5 – 0.6.
- يُنقل المستنبت إلى أنابيب 250 مل ثم يُثقل بالسرعة 4000 (Break 6) مدة 15دقيقة ثم التخلص من الطافي.
- يُضاف 250 مل 1 mM Hepes pH 7.0 ويمزج ببطء.
- يُثقل مدة 10 دقائق بسرعة 4000 rpm والتخلص من الطافي.
- يُضاف 250 مل 10 % glycerol و يمزج ببطء.
- يُثقل مدة 10 دقائق بسرعة 4000 rpm ثم التخلص من الطافي.
- يُضاف 125 مل 10 % glycerol ويمزج ببطء.
- يُثقل مدة 10 دقائق بسرعة 4000 rpm والتخلص من الطافي.
- يُعاد تعليق الراسب بـ1 مل GYT بارد ويُنقل الطافي لأنابيب 1.5 مل.
- يُقاس تركيز الخلايا على طول موجة 600 nm بعد التمديد 0.5/100.
- تُوزع الخلايا على أنابيب وتُحفظ بالـ – 80ْ م.

2.7.2. التخريم الكهربائي للبكتيريا المهيئة:

المواد المستخدمة:

- LB Agar with Ampicilin
- SOB: (2% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 10mM NaCl, 2mM KCl).
- Mg^{++}: (1M $MgCl_2.6H_2O$, 1M $MgSO_4.7H_2O$).
- SOC: (20mM Glucose 2M, 20mM Mg^{++} 2M, SOB).

طريقة العمل :

- ضمن أنابيب ايبندروف باردة يجمع مزيج البلازميد (على الأقل 5µl) والخلايا البكتيرية المهيئة (40µl).
- يُنقل المزيج إلى كوفيتات الصعق 1mm electroporation cuvette (Biorad®)، يُحضن بالثلج مدة دقيقة واحدة.

- تُجفف الكوفيت جيداً ثم توضع ضمن جهاز الصعق ويشغل الجهاز بشدة 1.8 kV/cm.
- يُضاف 1 مل من محلول الـ SOC و يمزج جيداً ثم يُنقل الوسط إلى أنابيب ايبندروف.
- يُحضن الأنابيب مدة ساعة بالدرجة 37ْ م مع الرج.
- يُستنبت 200 µl من البكتيريا الحاوية على البلازميدات المعبرة عن الأضداد النانوية على أطباق LB مع امبسيلين يُحضن طوال الليل على درجة حرارة 37ْ م.
- انتقاء عدد من المستعمرات البكتيرية بواسطة التفاعل السلسلي للبوليميراز باستخدام المرئستين المرئسة الموجهة RP والمرئسة العكسية FP.

8.2. تقنيات البروتين: Protein techniques

1.8.2. التعبير البروتيني: Protein expression

يتيح البلازميد pHEN6 التعبير عن الأضداد النانوية، بحيث تحوي على التسلسل الاشاري (PelB) وذيل متعدد الهستيدين في الطرف الكربوكسيلي. يمكن التسلسل الاشاري من الانتقال إلى المحيط البيربلازمي للبكتيريا مما يسمح بتنقيته باستخدام طريقة الصدمة الحلولية ضمن موقي مشبع بالسكاروز (TES).

<u>المواد المستخدمة:</u>

- TB per liter: (2.3 g KH2PO4, 16.4 g K2HPO4.3H2O, 12 g Tryptone, 24 g Yeast, 4 ml 100% glycerol)
- Ampicillin:100 mg/ml.
- 2mM $MgCl_2$.
- 0.1% glucose.
- IPTG: 1M (Duchefa Biochemie®).
- TES: (0.2M Tris pH8.0, 0.5mM EDTA, 0.5M sucrose).
- TES/4: TES diluted 4 times in water.

<u>طريقة العمل :</u>

اليوم الأول:

- استنبات مستعمرة بكتيرية في 10 مل LB حاوي امبسيلين وحضن بالدرجة 37ْ م مدة 16 ساعة مع الدوران.

اليوم الثاني:

- استنبات 1 مل من المستعمرة السابقة في 250 مل TB حاوي أمبسيلين وغلوكوز 0.1 % و 2 mM MgCl2.

- ➢ حضن بالدرجة 37 م مع الدوران 200 rpm لتصبح OD600 = 0.6-0.9.
- ➢ إضافة 1 mM IPTG ويتم الحضن بالدرجة 28° م مدة 16 ساعة.
- ➢ اليوم الثالث:
- ➢ تثفيل البكتيريا مدة 5 دقائق بسرعة 8000 rpm ويتم التخلص من الطافي.
- ➢ يعاد تعليق الراسب بـ3 مل TES ويتم الحضن بالثلج مدة ساعة مع الرج.
- ➢ إضافة 6 مل TES/4 ويتم الحضن بالثلج مدة ساعة مع الرج.
- ➢ تثفيل مدة 30 دقيقة بسرعة 8000 rpm وبالدرجة 4 م والتخلص من الراسب.
- ➢ يحوي الطافي الناتج على بروتينات السيتوبلازما ومن بينها الضد النانوي المعبر عنه.

1.1.2. تنقية البروتين المأشوب بوساطة كروماتوغرافيا الألفة:

يمرر الطافي المحضر من المرحلة السابقة والحاوي على بروتينات البكتيريا والأضداد النانوية على عمود الفصل المشبع بشوارد النيكل، وذلك باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة، فترتبط الأضداد النانوية بشوارد النيكل نظراً لاحتوائها على ذيل عديد الهسيتدين ذو الألفة العالية لشوارد النيكل، في حين أن البروتينات المتبقية في الخلاصة تغادر العمود مع سائل الغسل. يتم فصل بروتين الضد النانوي من العمود باستخدام محلول موقي يحتوي على إيميدازول ذو إلفة لشوارد النيكل ومنافس لزمرة الهيستيدين السداسية. ثم يتم ديلزة البروتينات المنقاة بوساطة أنابيب Concentretar (Viva sceience ®) للتخلص من آثار الايميدازول.

<u>المواد المستخدمة</u>

- 8 X Phosphate buffer (pH 7.4): (80 mM Na_2 HPO_4. $7H_2O$, 4M NaCl, 80 mM $Na_2HPO_4.H_2O$)
- 2M Imidazole (pH 7.4).
- Binding Buffer: (Phosphate buffer 1 X, 20 mM Imidazole).
- Elution Buffer: (Phosphate buffer 1 X, 250 mM Imidazole).
- Ethanol 20%.
- BPS 1X

<u>طريقة العمل:</u>

- ➢ تهيئة عمود التنقية بتمرير 10 ml من محلول Binding Buffer.
- ➢ تحضير عينة البروتين المراد تنقيتها، حيث يتم إضافة محلول 8× Phosphate buffer بتركيز نهائي 1x، ومحلول 2 M Imidazole بتركيز نهائي 20 mM لعينة البروتين المُستخلصة.
- ➢ تمرير عينة البروتين على عمود التنقية بمُعدل تدفق 2 ml / min.
- ➢ إعادة غسل عمود التنقية بـ 10 ml من محلول الـ Binding Buffer.

- فك ارتباط البروتين المأشوب بعمود التنقية من خلال تمرير 10 ml من محلول الـ Elution Buffer.
- إضافة البروتينات المنقاة لأنابيب الديلزة (Concentretar) بقطر الثقوب أصغر من 5000 Da، وتثقيل مدة 15 دقيقة بسرعة 12000 xg، والتخلص من الراشح.
- إضافة 15 مل من PBS 1X إلى الأنبوب من جديد بهدف غسل البروتينات، وتثقيل مدة 15 دقيقة بسرعة 12000 xg.
- إضافة 300 µl من PBS 1X للأنبوب والمزج عدة مرات حتى يتم خلط PBS مع البروتينات المحجوزة على الغشاء.
- سحب البروتينات من أنابيب الديلزة إلى أنبوب ايبندورف (1.5 مل)، وقياس تركيزه على جهاز الـ Nanodrop ومن ثم حفظه بالدرجة 4°م.
- التأكد من البروتين المُنقى من خلال ترحيله على هلامة الأكريلاميد.

2.2. تفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية للأضداد النانوية المنقاة:

المواد المستخدمة:

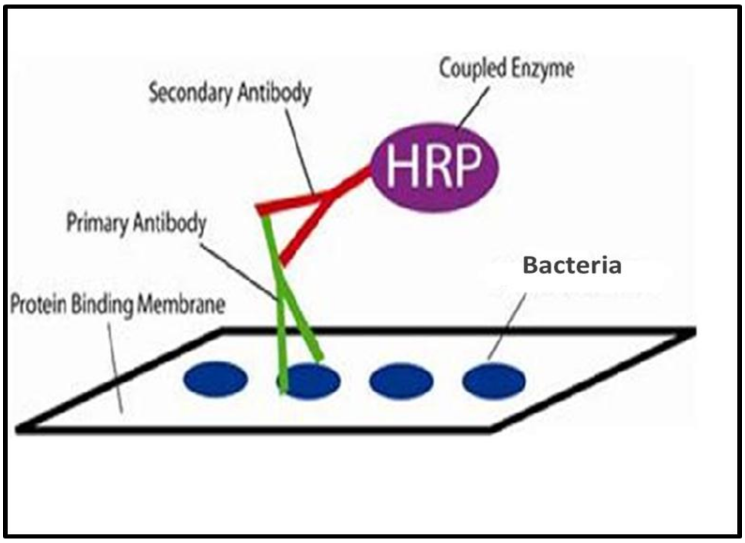
- T-PBS (Tween-20 0.05% in PBS 1X).
- Blocking buffer (skimmed milk 5% in PBS 1X).
- Antibody dilution buffer (Skimmed milk 2% in PBS 1X).
- TMB
- 1.M. H_2SO_4.

طريقة العمل :

- تثبت المستضدات بتركيز µg / µl 1 في صفيحة 96 بئر وتحضن لمدة ساعتين في الحاضنة بالدرجة 37°م او في البراد لليوم التالي.
- بعد عملية الحضن تسكب المستضدات من الصفيحة ويضاف 200 µl من موقي التغطية لكل بئر وتحضن الصفيحة لمدة ساعنين في الحاضنة بالدرجة 37°م .
- تغسل الصفيحة بموقي الغسيل T-PBS 5 مرات في غسالة الصفائح .
- يضاف 100 µl من الضد النانوي لكل بئر وتحضن الصفيحة لمدة ساعة في الحاضنة بالدرجة 37°م.
- تغسل الصفيحة بموقي الغسيل T-PBS 5 مرات في غسالة الصفائح.
- يضاف 100 µl من Anti-His- HRP بتمديد 1/1000 الموسوم بالبيروكسيداز وتحضن الصفيحة لمدة ساعة في الحاضنة بالدرجة 37°م.

- ➢ تغسل الصفيحة بموقي الغسيل T-PBS 5 مرات بغسالة الصفائح ثم يضاف 50 µl من الركيزة TMB وتحضن عدة دقائق في الظلام حتى ظهور اللون الازرق.
- ➢ يُوقف التفاعل بإضافة 30 µl 0.2M H_2SO_4 لكل بئر كى يصبح اللون أصفر.
- ➢ قراءة الامتصاصية على طول موجة 450 nm وتحليل النتائج.

3.2. التبصيم المناعي البكتيري للأضداد النانوية:



الشكل 19: التبصيم المناعي للاضداد النانوية

يوضح الشكل مراحل التبصيم المناعي وكيفية نقل العصائب من الهلامة الى غشاء نتروسيللوز ثم عملية الكشف عن هذه المستضدات من خلال اضافة الضد الأولي والضد الثانوي الموسوم ثم كشف التفاعل بإضافة الركيزة لأنزيم البيروكسيداز التي تتحول إلى لون مترسب.

المواد المستخدمة:

- T-PBS (Tween-20 0.05% in PBS 1X).
- Blocking buffer (skimmed milk 5% in PBS 1X).
- Antibody dilution buffer (Skimmed milk 2% in PBS 1X).
- TMB substrate
- Stop solution (0.2N H_2SO_4).

طريقة العمل :

- ➢ توضع نقاط حاوية على الكميات المطلوبةم ن البكتيريا على غشاء النتروسيللوز ويترك ليجف (الشكل 19).
- ➢ يُوضع الغشاء في موقي التغطية ويحضن لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة.
- ➢ يوضع الضد النانوي بتركيز 1/500 ويحضن مدة ساعة في درجة حرارة الغرفة.
- ➢ يُغسل الغشاء بـ T-PBS ثلاث مرات لمدة 10 دقائق في كل مرة.

- يُوضع الضد الأول Rabbit- anti- camel بتمديد 1/2000 ويحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- يُغسل الغشاء بـ T-PBS ثلاث مرات لمدة 10 دقائق في كل مرة.
- يُوضع الضد الثانوي الموسوم Goat- anti- rabbit بتمديد 1/2000 ويحضن لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة.
- يُغسل الغشاء بـ T-PBS ثلاث مرات لمدة 10 دقائق في كل مرة.
- تُوضع الركيزة TMB لمدة عشر دقائق حتى ظهور اللون.
- إيقاف التفاعل بـH_2SO_4.

الفصل الثالث

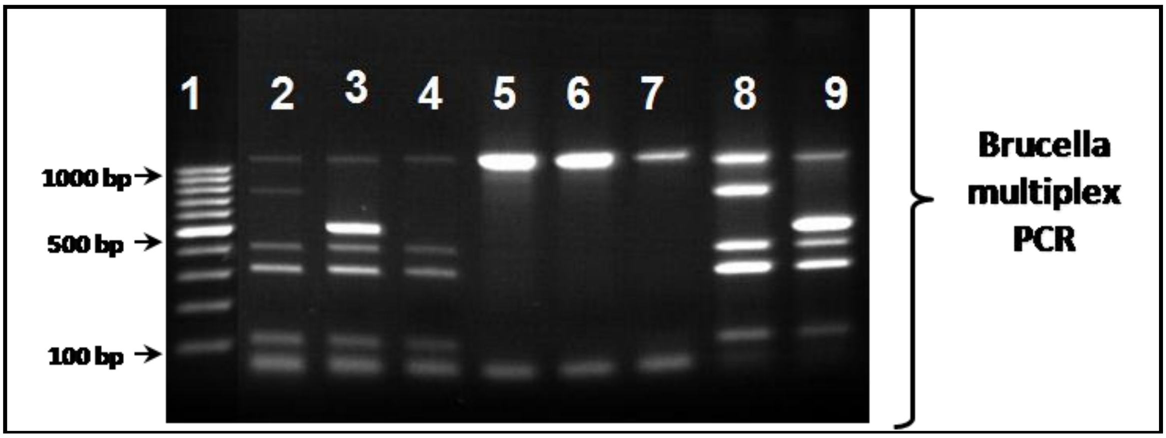
النتائج والمناقشة

Result and Discussion

3. النتائج والمناقشة: Results and Discussion

1.3. تحديد نقاوة السلالات البكتيرية باستخدام تفاعل البلمرة:

تم عزل الـ DNA الجينومي لسلالات البكتيرية المستخدمة في الدراسة، ومن ثم تحديد تركيزه بغية استخدامه في نوع خاص من تفاعلات الـ PCR يدعى بتفاعل البلمرة متعدد الشدف (Multiplex PCR) الذي تمت أمثلته مسبقاً في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات بغرض تحديد نقاوة عزلات البروسيلا المحلية. استخدم في هذا النوع من تفاعلات البلمرة عدة أزواج من المرئسات النوعية لبعض المورثات المحافظة لجنس البروسيلا أو النوعية لبعض الأنواع ضمن هذا الجنس، والمرئسات العامة لجميع الأجناس البكتيرية. وبعد إجراء التفاعل تم ترحيل شدف الدنا الناتجة عبر هلامة الأغاروز ومقارنتها مع سلم الدنا الجزيئي لتحديد أطوالها بغية التأكد منها. تم ترحيل شدف الـ DNA على هلامة الأغاروز حيث تظهر مجموعة من العصابات الخاصة بجنس *Brucella* بطول تقريباً (302 – 393 bp) العصابة المميزة للـ *B. melitinsis* بطول (700 bp) والعصابة العامة المميزة لكافة الاجناس البكتيرية بطول (1000bp) كشاهد عن وجود الـ DNA البكتيري بصورة عامة في تفاعل البلمرة المسار(1) يظهر الواسم الجزيئي للدنا DNA marker. حيث أظهرت النتائج نقاوة سلالة البروسيلا المستخدمة وتبعيتها لنوع البروسيلا الضأنية *B. melitensis* وذلك بخلاف سلالة اليرسينيا التي أعطت شدفة الدنا العامة (شكل 20).

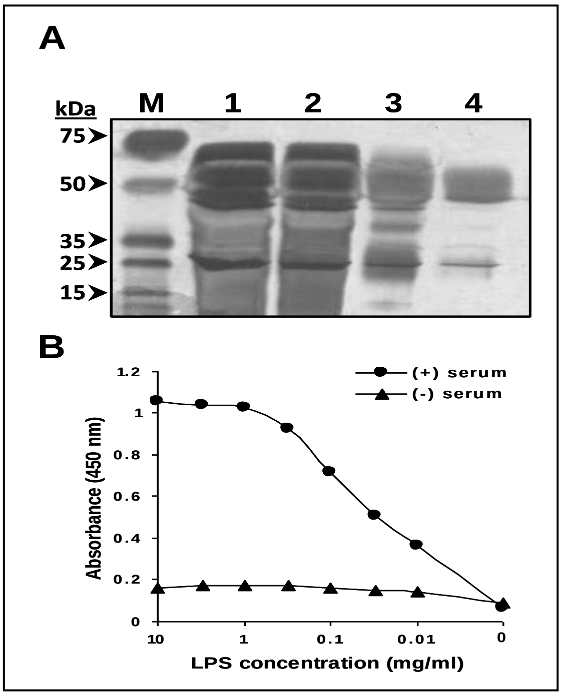


الشكل 20: تمييز السلالات باستخدام الـ Multiplex PCR.

بعد اجراء تفاعل Multiplex PCR على عينات الدنا المحضرة من الاجناس البكتيرية التابعة (مسار2) *B.melitinsis*، (مسار 3) *B.aborts* ، (مسار 4) *B.ovis* (مسار5) (O9) *Yersinia*.(مسار 6) (O3) *Yersinia* (مسار 7) *E.coli*، المسار(1) يظهر الواسم الجزيئي للدنا DNA marker.

2.3. تحضير متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا واليرسينيا:

في هذا العمل تم تحضير مستخلص متعدد السكاريد اللبيدي بطريقة تم نشرها حديثاً (Yi and Hackett, 2000) وذلك للميزات والسهولة التي وصفت بها مقارنة مع غيرها من الطرائق التقليدية حيث استخدمنا مادة TRI Reagent. هذه المادة التي تمكننا من الحصول على متعدد السكاريد اللبيدي بصورة نقية وبأكبر كمية ممكنة في حين أن الطرق السابقة كانت تعتمد على مادة الفينول الساخن . كما قمنا باختبار نقاوة وكفاءة تحضير هذه المستخلصات عن طريق ترحيلها عبر هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) ومن ثم صبغها بنترات الفضة (الشكل 21 A) بطريقة تم نشرها أيضا (Al-Hendy *et al.*, 1991). من ناحية اخرى، بغرض تحديد التركيز الأنسب من متعدد السكاريد اللبيدي النقي الذي يجب استخدامه تم بإجراء تفاعل مقايسة مناعية إنزيمية على تراكيز متدرجة (الشكل 21 B). نتيجة هذه التجربة وكما هو متوقع فإن مصل الجمل الممنع بخلاصة البروسيلا، والذي منه قد تم تحضير المكتبة المورثية، قادر على الارتباط وبكفاءة بمتعدد السكاريد اللبيدي وذلك بخلاف مصل الجمل الشاهد وهذا يؤكد على أهميته الاستمناعية ومقدرته الكامنة على تحريض تشكل الأضداد أثناء عملية تشكيل الاستجابة المناعية (Tumurkhuu *et al.*, 2006). وتبين أيضاً بنتيجة هذه التجربة أن التركيز (1μg/μl) هو الأنسب حيث تنخفض بعده قدرة مصل الجمل على الارتباط بمتعدد السكاريد اللبيدي النقي، و هو الذي سيتم اعتماده لاحقاً في كافة اختبارات المقايسة المناعية الإنزيمية وفي عملية غربلة المكتبة المورثية.



الشكل 21: اختبار فعالية مصل الجمل الممنع بخلاصة البروسيلا نحو متعدد السكاريد اللبيدي النقي
(A) ناتج ترحيل كميتين مختلفتين (40 µg في المسارين 2،1 و10 µg في المسارين 3، 4) من متعدد السكاريد اللبيدي، المحضر من البروسيلا (مسار 1، 3) واليرسينيا (مسار 2، 4)، عبر هلامة الأكريلاميد ومن ثم صبغها بنترات الفضة. يمثل المسار الأول البروتينات المحددة الطول في سلم البروتينات الجزيئي (Protein marker). (B) اختبار الإليزا لتحديد فعالية مصل جمل (بتمديد 5000/1)، ممنع بالبروسيلا (+) وآخر شاهد (-)، نحو تراكيز متدرجة (من 0 لغاية 10 ملغ/مل) من متعدد السكاريد اللبيدي المحضر من البروسيلا

3.3. اختبار فعالية الأنواع المختلفة من أضداد مصل الجمل الممنع بالبروسيلا تجاه متعدد السكاريد اللبيدي النقي:

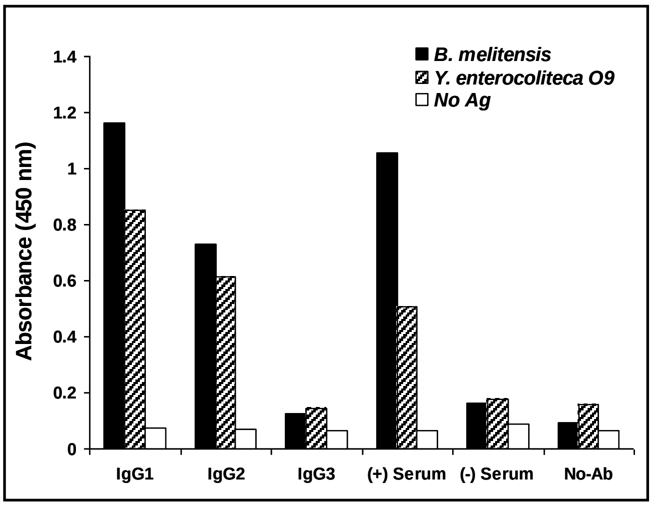
إن عائلة الجمال، والتي تعود إليها الجمال الافريقية ذات السنم الواحد والآسيوية ذات السنمين وحتى حيوانات اللاما، جميعها تحتوي في أمصالها إضافة للأضداد التقليدية نوع الأضداد ذات السلسلة الثقيلة التي منها تشتق الأضداد النانوية(De Genst *et al.*, 2006). يمكن فصل هذه الأنواع المختلفة من الأضداد من المصل الدموي باستخدام الكروماتوغرافيا التفاضلية ذات الإلفة (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

لقد تم فصل هذه المكونات الضدية المختلفة، التقليدية (IgG1) وذات السلسلة الثقيلة (IgG2 and IgG3)، مسبقاً من مصل الجمل الممنع وتم اختبار فعاليتها على الخلاصة العامة للبروسيلا (قيد النشر Abbady *et al.*,). حيث أن IgG2 يختلف عن IgG3 بأن منطقة المفصلة قصيرة في حين أن IgG3 منطقة المفصلة طويلة.

تم إجراء اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية للتأكد من قدرة الأنواع المختلفة من الأضداد

الموجودة في مصل الجمل في التعرف على متعدد السكاريد اللبيدي النقي ولمعرفة فيما إذا كانت هذه الأضداد ذات السلاسل الثقيلة قادرة على تميز البروسيلا عن اليرسينيا وتمت مقارنتها مع فعالية المصل ككل من الجمل الممنع ومن آخر شاهد نحو متعدد السكاريد اللبيدي لكل من البروسيلا واليرسينيا (شكل 22).

لقد أظهرت هذه التجربة قدرة مختلف الأشكال الضدية التقليدية (IgG1) والثقيلة من النمط (IgG2) على ربط متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا بصورة فعالة مقارنة بفعالية المصل الشاهد أو الشرط حين غياب الأضداد (No Antigen). أيضا فإن هذه الأضداد كان لها القدرة على ربط متعدد السكاريد اللبيدي لليرسينيا وإن بدرجة أقل مما هو الحال مع البروسيلا. هذه النتيجة من تدعم حقيقة التشابه الكبير في البنية العامة بين السلالتين لمتعدد السكاريد اللبيدي (Tumurkhuu *et al.*, 2006 ;Weynants *et al.*, 1996).



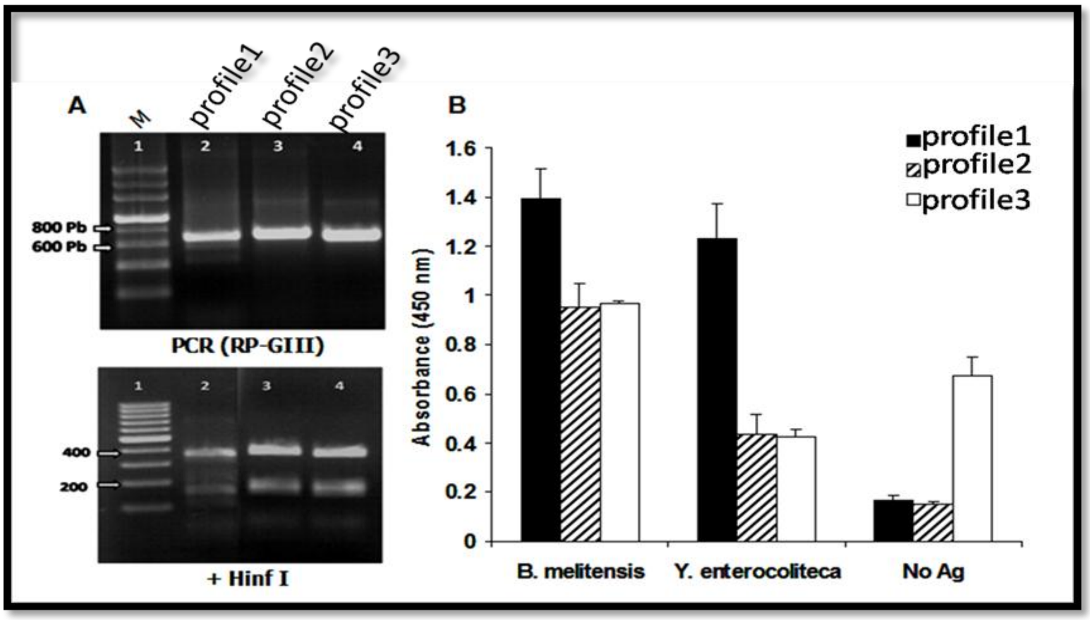
الشكل 22: اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية لتحديد فعالية مجموعة الأضداد المختلفة.

اختبار فعالية الأضداد التي تم تنقيتها من مصل دم الجمل الممنع بالبروسيلا (IgG1,IgG2,IgG3)، وذلك بغياب (No Ag) أو وجود متعدد السكاريد اللبيدي (بتركيز 1 ملغ/مل) المحضر من البروسيلا واليرسينيا. وقد استخدم المصل ككل (بتمديد 5000/1) من جمل ممنع (+) وآخر شاهد سلبي للمقارنة وكان الشرط (No Ab) بمثابة دليل على غياب الفعالية بغياب الأضداد.

4.3. انتقاء أشكال ضدية نانوية نوعية لمتعدد السكاريد اللبيدي باستخدام تقنية الفاجات العارضة:

تعتبر تقنية الفيروسات العارضة من أشهر التقنيات التي تستخدم بغرض العزل الإنتقائي لبعض الأشكال الرابطة الفعالة وذلك انطلاقاً من مكتبات مورثية عالية التنوعية (Clackson *et al.*, 1991). لقد كان استخدام هذه التقنية مركزاً في السابق على عزل الأضداد المؤشبة الناتجة عن دمج المجالين المتنوعين لكل من السلسلتين الثقيلة والخفيفة من الأضداد

التقليدية أومايعرف اختصاراً بالشدفة المتنوعة أحادية السلسلة ScFv (single-chain variable fragment). وقد كان هناك الكثير من المحاولات لعزل أمثال هذه التراكيب النوعية للعديد من المستضدات والتي من بينها متعدد السكاريد اللبيدي العائد للعديد من الأنماط البكتيرية. تم بنجاح مؤخراً عزل عدد من هذه الأضداد المؤشبة النوعية للبروسيلا بالرغم من المشاكل التي تعلقت بانحلاليتها وثباتيتها (Hayhurst *et al*., 2003). وفرت تقنية الأضداد النانوية حلاً بديلاً لمثل هذه المشاكل التي ترافق إنتاج شدف الأضداد المؤشبة التقليدية. ولدى دمجها بالمكتبة المورثية الاستمناعية وتقنية الفيروسات العارضة فإنه يمكننا عزل العديد من الأضداد ذات النوعية العالية والثباتية المشجعة (Wesolowski *et al*., 2009) لقد تم حديثاً ابتكار تقنية الفيروسات العارضة الطرحية و باستخدامها عزلت أضداد نانوية قادرة على التعرف على أحد أنواع الديدان الشريطية وتمييزه عن نوع شبيه من نفس الجنس (Deckers *et al*., 2009). وفي هذا العمل، لجأنا لنفس الأسلوب الطرحي، حيث أنه وانطلاقاً من المكتبة المورثية ذاتها، طبقنا تقنية الفيروسات العارضة بداية بمتعدد السكاريد اللبيدي لليرسينيا واسترجعنا كامل الفيروسات العارضة للأضداد النانوية غير المرتبطة لنعزل منها الأشكال الضدية النوعية للبروسيلا. لقد حققت هذه الطريقة مقصدها وحصلنا على العديد من المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات كاملة للأضداد النانوية بحيث تقع أطوالها ضمن المجال المتوقع (700bp) كما أكده اختبار البلمرة باستخدام مرئسات تحيط بموقع مورثة الضد النانوية في بلازميد التعبير الفيروسي، وبشكل عام كانت جميعها تتبع لواحد من ثلاثة أشكال ضدية متكررة. ومورثات الأضداد النانوية تلك بالرغم من تشابه الهيئة الشدفية التي نتجت بتقطيعها بأنزيم التقييد (HinfI) ذو موقع القطع الخماسي وبالتالي احتمالية تكرارية ظهوره كبيرة (الشكل 23A)، والتي تعد طريقة تقليدية سريعة لكشف أختلاف – وليس بالضرورة تشابه - الأنماط الضدية النانوية المعزولة، فإن تفاعل السلسلة أكد اختلافها فيما بينها في التسلسل الداخلي. قد يكون مرد ذلك التشابه الجزئي للأشكال الضدية فيما بينها إلى كون متعدد السكاريد اللبيدي فقير في بنيته الفراغية بالمعينات المستضدية مما يستدعي كون الأضداد النانوية نتجت عن ذات السلف المشترك من الخلايا البائية التي تطورت خلال عملية الأستجابة المناعية لدى الجمل. لدى اختبار فعالية الأضداد النانوية المعبر عنها من ممثلين من كل من هذه الأنماط الضدية الثلاثة، تبين أن النمط الأول ذو فعالية محافظة تجاه متعدد السكاريد اللبيدي لكل من البروسيلا واليرسينيا في حين أن النمطين الآخرين أبديا فعالية مغايرة تجاه هذين النوعين من متعدد السكاريد اللبيدي (الشكل 23B).



الشكل 23: انتقاء بعض الأشكال الضدية النانوية من المكتبة المورثية للأضداد النانوية للبروسيلا

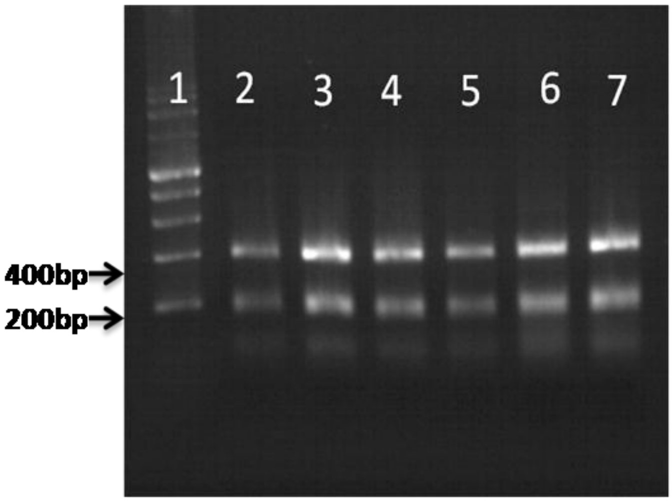
(A) ناتج ترحيل شدف الدنا الناتجة عن تفاعل البلمرة، باستخدام المرئستين (RP, GIII)، اجري على المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية الناتجة عن عملية غربلة المكتبة المورثية وذلك بعد ترحيلها عبر هلامة الأغاروز. (إلى الأسفل) ناتج ترحيل ذات الشدف ولكن بعد أن إجري لها عملية تقطيع باستخدام أنزيم التقييد (Hinf I). في كلا الهلامتين يمثل المسار الأول واسم الدنا الجزيئي (DNA marker). (B) ناتج اختبار الإليزا لتحديد فعالية الفاجات العارضة للأضداد النانوية، و التي نتجت عن الإشكال البكتيرية الثلاث، نحو متعدد السكاريد اللبيدي المحضر من كل من البروسيلا واليرسينيا (1µg/well) وذلك مقارنة بفعاليتها في غياب المستضدات ككل (No Ag).

5.3. إعادة تنسيل مورثات الأضداد النانوية المنتقاة في بلازميد التعبير البروتيني:

تم عزل مورثات هذه الأضداد من البلازميد (pHEN4) وذلك من أجل تنسيلها من جديد في بلازميد مشتق من السابق ويدعى (pHEN6)، وهذا البلازميد يسمح بالتعبير عن البروتينات بكميات كبيرة في البكتيريا (WK6). وقد تمت هذه العملية وفق المراحل التالية:

1.5.3. عزل وتقطيع مورثات الاضداد النانوية:

تم استخلاص البلازميد (pHEN4) الحاوي على مورثة الأضداد النانوية ست مستعمرات بكتيرية بوساطة تقنية الـ Miniprep. بعد ذلك تم تضخيم مورثات الأضداد النانوية بتفاعل البلمرة باستخدام المرئسين (المرئسالموجه RP والمرئس العكسي GIII) وتقطيع ناتج التضخيم بأنزيمي التقييد الـ BstEII والـ PstI من أجل تنسيل هذه المورثات في بلازميد التعبير البروتيني (pHEN6)،ثم تم ترحيل ناتج القطع على هُلامة آغاروز 1.5 %، حيث حصلنا على عُصابتين،الأولى ذات الطول 400 bp تمثل مورثات الأضداد النانوية، والثانية بطول 250 bp تمثل شدف الـ DNA الطرفية المجاورة لمورثة الضد النانوي (الشكل 24).



الشكل 24: ناتج قطع مورثات الاضداد النانوية

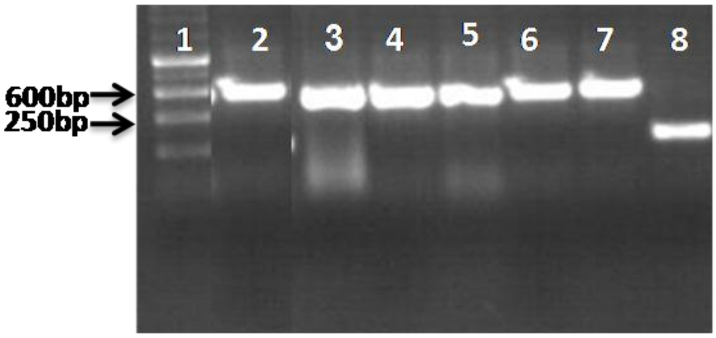
يوضح الشكل ناتج تقطيع مورثات الأضداد النانوية بأنزيمي التقييد الـBstEII والـPstI وترحيلها عبر هلامة آغاروز 1.5 %. حيث يمثل المسار الأول واسم DNA الجزيئي بينما تحوي المسارات الأخرى شدف DNA الناتجة عن عملية قطع مورثات الأضداد النانوية من كل من المستعمرات الستة المنتقاة.

2.5.3. تنقية مورثات الاضداد النانوية من الهلامة:

تم تنقية مورثات الأضداد النانوية بعد معاملتها بإنزيمات التقييد الـ BstEII والـ PstI. كما تم أيضا معاملة بلازميد التعبير المورثي الـ (pHEN6) بنفس الانزيمات ثم ترحيل كلاً منهما على هُلامة أغاروز وتنقيتهما من الهلامة، ثم تم الانتقال إلى المرحلة التالية وهي ربط المورثة إلى البلازميد باستخدام تفاعل الالتحام (Ligation) باستخدام أنزيم الربط Ligase T4.

3.5.3. التحوير البكتيري:

بعد عملية ربط المورثة الى بلازميد التعبير البروتيني (pHEN6) تم ادخاله الى السلالات البكتيرية (WK6) *E.coli* بطريقة الصعقة الكهربائية (**Electroporation**) ثم تم التأكد من نجاح عملية التحوير البكتيري من خلال إجراء تفاعل الـ PCR باستخدام المرئستين (RP, FP)، على المستعمرات البكتيرية الحاوية على التراكيب البلازميدية التي تم التحوير بها ولدى ترحيل ناتج التفاعل عبر هلامة الأغاروز نلاحظ نوعين من العصابات عصابات بطول 600 وهي تمثل شدف الـ DNA المضخمة انطلاقا من المستعمرات البكتيرية الحاوية على البلازميد الذي يحوي مورثة الضد النانوي، أما العصابات التي بطول 260 فهي تمثل شدف الـDNA المضخمة انطلاقاً من المستعمرات البكتيرية الحاوية على البلازميد الذي لا يحوي مورثة الضد النانوي (الشكل 25).



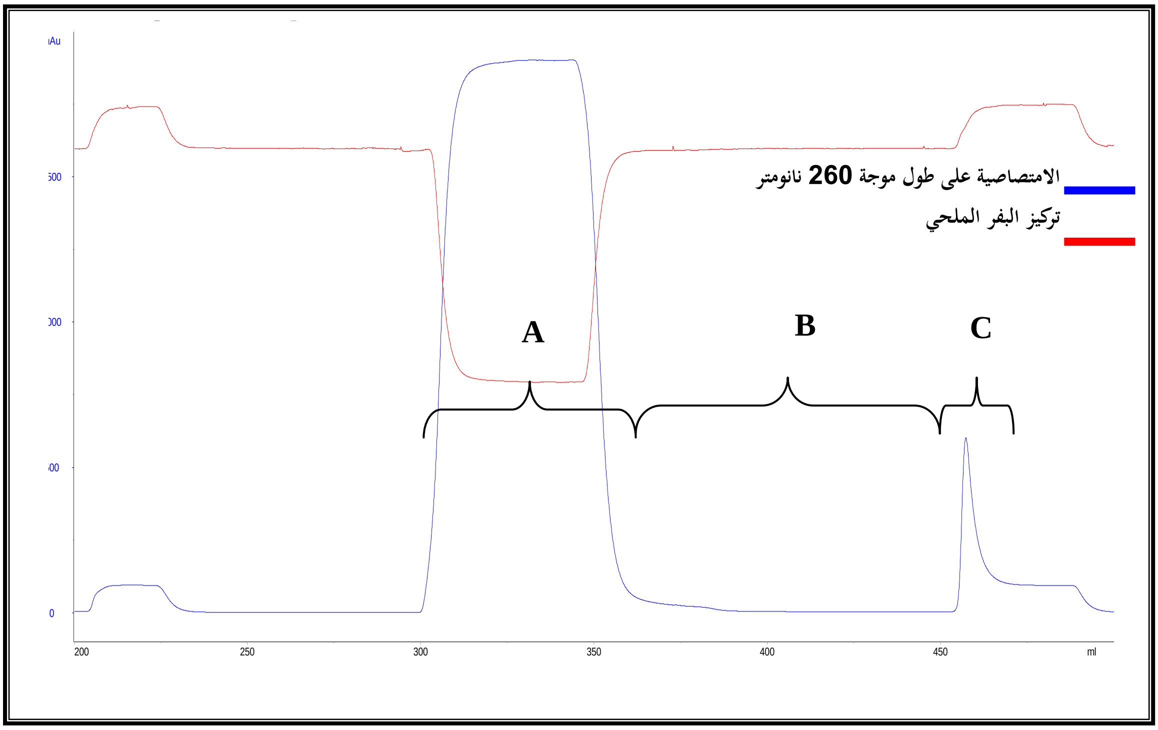
الشكل 25: تفاعل البلمرة للمستعمرات البكتيرية الحاوية البلازميد (pHEN6)

تم إجراء تفاعل الـ PCR للمستعمرات البكتيرية باستخدام المرئسين (RP,FP) ومن ثم ترحيلها عبر هلامة الأغاروز حيث يمثل المسار الأول واسم DNA الجزيئي وتمثل المسارات (2-7) شدف DNA الحاوية مورثات الأضداد النانوية من كل من المستعمرات البكتيرية المنتقاة بينما يمثل المسار (8) شدف DNA انطلاقا من المستعمرات البكتيرية الحاوية على البلازميد الذي لايحوي مورثة الضد النانوي.

4.5.3. تحريض التعبير البروتيني وتنقية الأضداد النانوية:

بعد التأكد من احتواء المستعرات البكتيرية على التراكيب البلازميدية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية، تم زرعها في أوساط سائلة انتقائية بوجود الصاد الحيوي المناسب. ومن ثم تحريض التعبير البروتيني للأضداد النانوية لديها باستخدام الـ (IPTG)، حيث يقوم بتحريض محضض مورثة الضد النانوي الموجودة في البلازميد (pHEN6)، وهذا البلازميد يسمح بالتعبير عن البروتينات بكميات كبيرة في البلازما المحيطية للبكتيريا ويكون ناتج التعبير البروتيني حاوي في الطرف الأميني على ذيل من ست أحماض هيسيتيدين أمينية (6xHIS)، إن هذه الخاصية تسمح بتنقية البروتين المعبر عنه (الضد النانوي) مخبرياً من

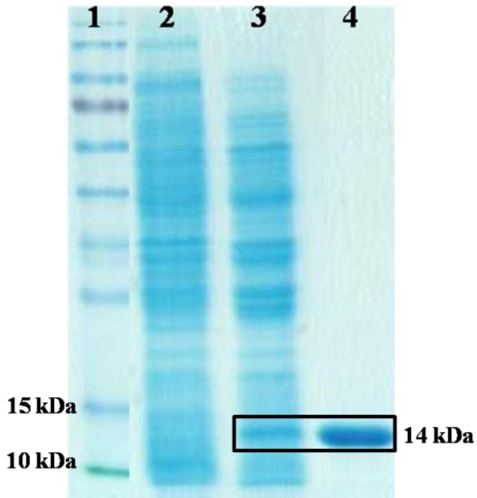
الخلاصة البكتيرية باستخدام تقنية الفصل بالأعمدة المشبعة بشوارد النيكل المعروفة بإلفتها العالية لأحماض الهيسيتيدين الأمينية الستة. لدى تمرير الخلاصة البكتيرية الحاوية على بروتين الضد النانوي على عمود فصل مشبع بشوارد النيكل، يتثبت بروتين الأضداد النانوية نظرا لاحتوائه على ذيل من ست أحماض هيستيدين ذات إلفة عالية لشوارد النيكل في حين أن الغالبية العظمى المتبقية من بروتينات الخلاصة تغادر العمود مع سائل الغسل بعدها تجري مرحلة مستفيضة من الغسل باستخدام محلول موقي للتأكد من خروج كامل البروتينات الغير متثبتة ، وبعد ذلك يتم فصل بروتين الضد النانوي عن العمود وتجميعه باستخدام موقي يحتوي على مركب كيميائي (إيميدازول) له صيغة كيميائية ذات إلفة لشوارد النيكل تمكنه من التنافس مع زمرة الهيستيدين السداسية (الشكل 26).



الشكل 26: .تنقية الأضداد النانوية باستخدام أعمدة الفصل المشحونة بشوارد النيكل
يظهر الشكل تغير امتصاصية العينة بعد خروجها من عمود التنقية المشحون بالنيكل، حيث يظهر (المجال A). أن الغالبية العظمى المتبقية من بروتينات الخلاصة تغادر العمود مع سائل الغسل أما (المجال B) يوضح استخدام محلول موقي للتأكد من خروج كامل البروتينات الغير متثبتة نهاية (المجال C) فصل بروتين الضد النانوي عن العمود وتجميعه باستخدام موقي يحتوي على مركب كيميائي (إيميدازول) له صيغة كيميائية ذات إلفة لشوارد النيكل تمكنه من التنافس مع زمرة الهيستيدين السداسية.

5.5.3. ترحيل الاضداد النانوية المنقاة على هلامة SDS-PAGE

للتأكد من حسن سير عملية التعبير البروتيني و التنقية وأيضا من نقاوة الأضداد النانوية الناتجة، تم ترحيل العينات البروتينة المختلفة عبر هُلامة عديد الاكريلاميد SDS، حيث يلاحظ بدأ ظهور الضد النانوي في الخلاصة البروتينية للبكتيريا بعد 16 ساعة من بداية التحريض بمادة (IPTG) مقارنة بالشاهد قبل التحريض (مسار2,3 شكل 27)، وقد تمت عملية عزل وتنقية الضد النانوي رقم 1 من النمط الأول (Profile1) الممثل لبقية الأضداد النانوية، من الخلاصة البروتينية باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا ذات الإلفة كما يظهر ذلك المسار رقم (4) من الشكل 27، ومنه يمكن تحديد الوزن الجزيئي للضد النانوي بحدود 14 كيلو دالتون بالمقارنة مع واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية.

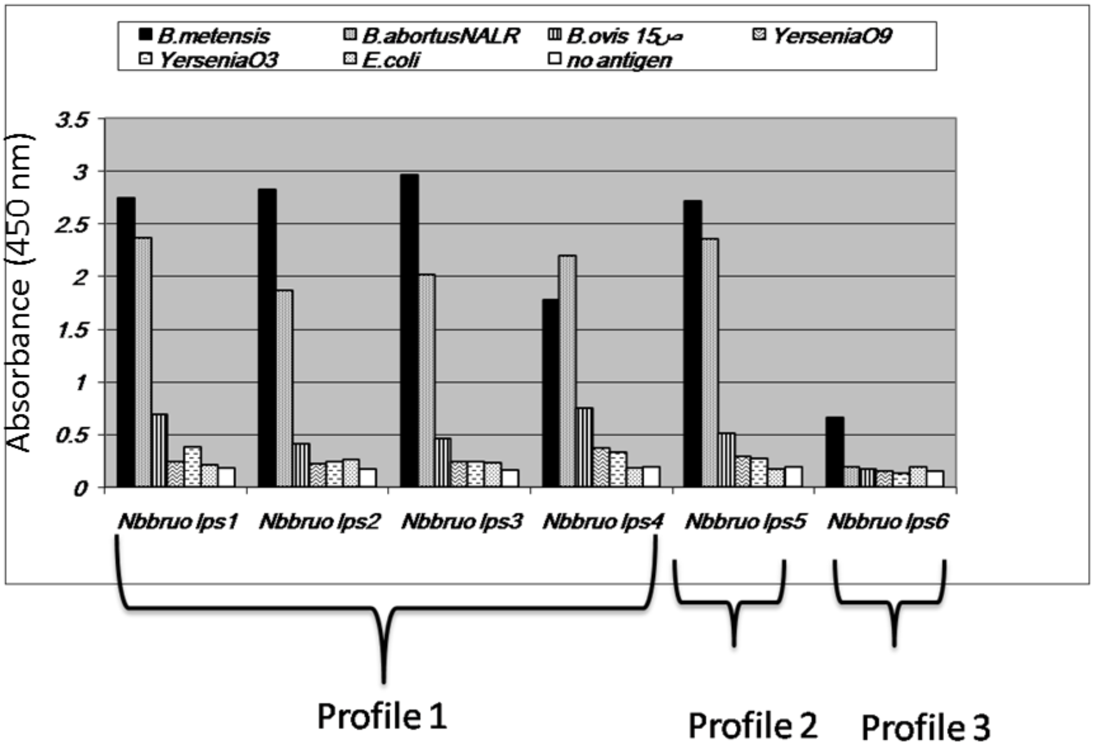


الشكل 27: ناتج ترحيل عينات مراحل تنقية الأضداد النانوية عبر هلامة عديد الاكريلاميد.
يوضح الشكل ناتج ترحيل بروتين الضد النانوي على هلامة عديد الأكريلاميد. حيث يمثل المسار الأول واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية، ويمثل المسار الثاني الخلاصة البكتيرية قبل عملية التحريض البروتيني، والمسار الثالث الخلاصة البكتيرية بعد 16 ساعة من عملية التحريض بإضافة IPTG ، والمسار الرابع بروتين الضد النانوي النقي حيث نلاحظ هجرته على مستوى يبلغ 14 كيلودالتون.

6.3. اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية للأضداد النانوية المنقاة:

عند اختبار الأضداد النانوية النوعية لمتعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا بتفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية تبين وجود عدد من الأضداد النانوية ذات فعالية نوعية تجاه متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا وقادرة على تمييزها بكفاءة عالية عن اليرسينيا.حيث تبين أن الاضداد النانوية المنقاة التابعة للنمط الأول Profile1 انظر الفقرة (4.3) أصبحت قادرة على تمييز البروسيلا عن اليرسينيا عند وجودها بشكلها الحر غير مرتبطة بالفاج. وهذا خلافاً لنتيجة الاليزا السابقة، حيث كانت نوعية للبروسيلا واليرسينيا وللتأكد من هذا الاستنتاج، تم

أخذ ثلاث أضداد نانوية أُخرى من النمط الأول للتأكد من عدم وجود خطأ وحصلنا على نفس النتيجة وتبين أن جميع هذه الأضداد النانوية الأربعة التابعة للنمط الأول نوعية للبروسيلا فقط عندما تكون حرة على شكل بروتين أما عندما تكون مرتبطة على سطح الفاج فإنها تصبح قادرة على ربط البروسيلا واليرسينيا. ويمكن أن يُعزى ذلك إلى تغير في البنية الفراغية للضد عندما يكون مرتبطاً على سطح الفاج مقارنة بحالته الحرة. أما بالنسبة للأضداد النانوية التابعة للنمط الثاني والثالث فقط أعطت نفس النتيجة السابقة وكانت ذات نوعية للبروسيلا فقط وللتأكد من نوعية الأضداد النانوية نحو متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا بأنواعها تم اختبارها مع العديد من متعددات السكاريد اللبيدية التابع لكل من البروسيلا بنوعيها الضأنية M16 والمجهضة NALR والبروسيلا الخنزيرية ص 15 واليرسينيا بنوعيها ذات النمط المصلي O3 ,O9 إضافة إلى الإشريكية الكولونية، حيث أعطت الأضداد النانوية قيم سالبة مع الأجناس البكتيرية الأخرى وقيم ايجابية مع نوعي البروسيلا الضأنية والمجهضة في حين أنها لم تعطي قيم ايجابية مع البروسيلا الخنزيرية ويعزى ذلك لأنها من النمط الخشن الذي يفتقد السلسلة (O- Antigen). وهذا ما يؤكد نوعية هذه الأضداد النانوية لمتعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا (الشكل 28).

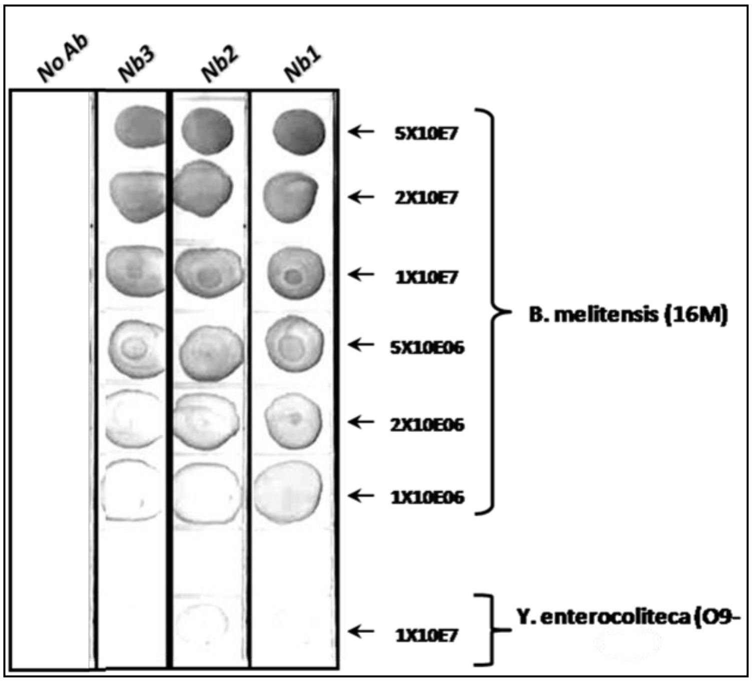


الشكل 28: اختبار نوعية الأضداد النانوية تجاه متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا

اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية لنوعية الاضداد النانوية الستة المنقاة بتمديد (1/500) حيث تم اختبارها مع متعدد السكاريد اللبيدي (1 µg/well) الضد 1 و 2 و3 و4 من النمط الأول والضد رقم 5 من النمط الثاني والضد رقم 6 من النمط الثالث تم اختبارها مع متعدد السكاريد اللبيدي المحضر من البروسيلا بنوعيها الضأنية M16 والمجهضة NALR وبروسيلا ص 15 واليرسينيا بنوعيها ذات النمط المصلي O3 O9, إضافة إلى الإشريكية الكولونية بالمقارنة مع الشاهد السلبي (بدون مستضد).

7.3. التبصيم المناعي للأضداد النانوية المنقاة:

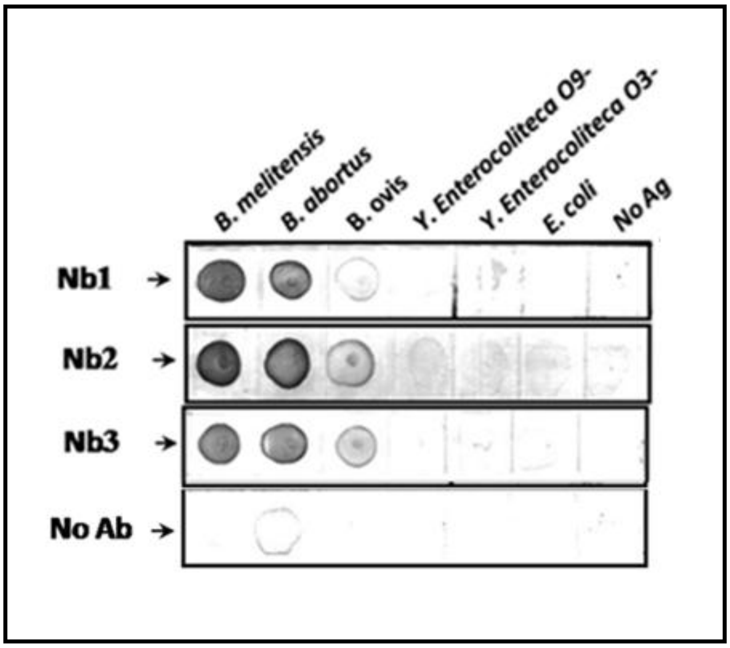
نظراً لمقدرة الأضداد النانوية على ربط متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا فقط تم اختبار قدرتها على كشف البكتيريا ككل في تقنية التبصيم المناعي البكتيري وذلك باستخدام لطخ على غشاء النتروسيللوز تحتوي تراكيز متتدرجة من بكتيريا البروسيلا الضأنية M16 (من التركيز 10^7 ×5 وحتى التركيز 10^6 ×1) والتركيز 10^7 ×1 من اليرسينيا ومن ثم تم الكشف عن وجود هذه البكتيريا باستخدام الأضداد النانوية المنقاة الممثلة للأنماط الثلاثة، حيث تم استخدام الضد النانوي رقم 1 من النمط الأول وتم ملاحظة قدرة جميع هذه الأضداد على كشف البروسيلا كبكتيريا بتراكيز حتى 10^6 ×5 وعدم تفاعلها مع اليرسينيا(الشكل 29).



الشكل 29: تفاعل التبصيم المناعي للاضداد النانوية المنقاة

يوضح الشكل قدرة جميع الأضداد النانوية على كشف البروسيلا كبكتيريا بتراكيز حتى 5×10^{6} وعدم تفاعلها مع اليرسينيا من خلال تفاعل التبصيم المناعي على غشاء النتروسيللوز. حيث تم الكشف عن هذه الاضداد النانوية باستخدام الضد الاولي Rabbit– anti– camel والضد الموسوم بالبيروكسيداز Goat– anti– rabbit وتم كشف التفاعل باضافة الركيزة لأنزيم البيروكسيداز التي تتحول إلى لون مترسب.

بنفس الطريقة تم دراسة قدرة الأضداد النانوية على كشف البروسيلا عن غيرها من الأجناس البكتيرية بتركيز 5×10^{7} حيث تم حضن هذه الأنماط الضدية الثلاثة (الضد رقم 1 من النمط الأول) مع أشرطة من أغشية النتروسيللوز بعد تلطيخها بأنواع مختلفة من جنس البروسيلا بنوعيها الضأنية M16 والمجهضة NALR وبروسيلا ص 15 واليرسينيا بنوعيها ذات النمط المصلي O9 و O3 ,إضافة إلى الإشريكية الكولونية وقد تمكنت جميع الأضداد النانوية من الأنماط الثلاثة مقارنة مع الشاهد السلبي من تمييز البروسيلا بنوعيها الضأنية والمجهضة وبصورة أقل البروسيلا الخنزيرية في حين أنها لم تتعرف إطلاقا على الأنواع البكتيرية الأخرى (الشكل 30)



الشكل 30: التبصيم المناعي البكتيري باستخدام الأضداد النانوية المنقاة

يوضح الشكل تفاعل التبصيم المناعي البكتيري الذي اجري على بكتيريا بتركيز $10^7 \times 5$ على الاجناس البكتيرية التابعة لـ *B melitinsis*، *B.aborts*، *B.ovis*، O9 *Yersinia* (O3) *Yersinia*، *E.coli* حيث يتم الكشف عن هذه البكتيريا باستخدام الاضداد النانوية بتمديد (1 /500) ومن ثم الضد anti- Rabbit- camel والضد الموسوم بالبيروكسيداز Goat- anti- rabbit.

لقد تمكنا في هذا البحث ولأول مرة من إنتاج أضداد نانوية نوعية لمتعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا، و حتى فيما يخص الضد النانوي ذو المقدرة العامة على ربط متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا واليرسينيا بما يدعو للتفاءل بقدرته على الربط العام لمتعدد السكاريد اللبيدي بما يشجع على استثماره كأداة قيمة في تطوير أدوات وأطقم تشخيصية لكشف تلوث العديد من العينات الطبية والدوائية بمتعددات السكاريد اللبيدي العائد من مصادر بكتيرية مختلفة (Hurley, 1995) وبالمقارنة مع الدراسات السابقة فانه إلى الان لا يوجد سوى ضد وحيد النسيلة قادر على التمييز بين البروسيلا واليرسينيا وبالتالي فان هذه الأضداد النانوية يمكن لها مستقبلا أن تكون بمثابة أدوات فعالة للتغلب على مشكلة التفاعلية التصالبية التي غالبا ما تصادف في اختبارات تشخيص هذين الجنسين (Mertens *et al.*, 2001). ولذلك فإن محاولة إنتاجنا لأضداد نانوية قادرة على تمييز متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا واليرسينيا يعتبر بمثابة تحد هائل وذلك نظراً لدرجة التشابه العالية في البنية، إذ تبلغ حد الـ 98% ، أي أننا ناورنا بنجاح ضمن نطاق الـ 2 % المتاحة من الاختلاف البنيوي، وهذا ما يبرهن مجددا على كفاءة هذه التقنية التي يمكن تخيل نجاح تطبيقها في مجالات ما كنا لنحلم بها في حالة الأضداد العادية إضافة إلى الميزات البنيوية الإضافية التي يتمتع بها الضد النانوية مقارنة بالأضداد العادية أو حتى شدفها المؤشبة.

الاستنتاجات:

لوحظ أن هناك ازدياد ملحوظ في عدد مرضى الحمى المالطية في مختلف أنحاء القطر العربي السوري كما أن هناك ازدياد بنسبة الإجهاض عند الأبقار والأغنام بشكل ملحوظ ومن الأسباب المباشرة لأنه لا توجد طريقة تشخيصية صحيحة تؤكد الإصابة بالبروسيلا لدى المضيف الطبيعي بسبب التشابه البنيوي بين البروسيلا وأجناس بكتيرية أخرى كاليرسينيا والسالمونيلا و الاشريكية الكولونية، لذلك كانت الحاجة ماسة إلى البحث عن طريقة تشخيصية جديدة واكثر دقة للتمييز بين البروسيلا واليرسينيا وذلك نظرا للتشابه الكبير في التركيب البنيوي في طبقة متعدد السكاريد اللبيدي حيث أن نسبة التشابه 98% وقد أثمرت نتائجنا في الحصول أضداد نانوية تستطيع التمييز بين هذين الجنسين بكفاءة عالية. ويمكن استخدامها مستقبلا كلقاح نوعي لداء البروسيلات.

التوصيات:

1. غربلة المكتبة المورثية للأضداد النانوية التي تم الحصول عليها وذلك من أجل إيجاد أضداد نانوية أخرى نوعية لبعض مستضدات البروسيلا ذات الأهمية.
2. دراسة أثر الحماية للأضداد النانوية ضد البروسيلا في المناعة المنفعلة التي ربما تكون لقاح جديد ضد البروسيلا.
3. استخدام الأضداد النانوية في تحديد معينات مستضدية من البروسيلا قادرة على استثارة الجهاز المناعي، فهي تكون بمثابة معينات استمناعية يمكن استخدامها في التشخيص أو العلاج.

الفصل الرابع

المراجع

References

4. المراجع

1. al-Hendy, A., P. Toivanen & M. Skurnik, (1991) Rapid method for isolation and staining of bacterial lipopolysaccharide. Microbiol Immunol 35: 331-333.
2. Al-Mariri, A., (2008) Ultraviolet C lethal effect on Brucella melitensis. New Microbiol 31: 47-55.
3. Al-Mariri, A., (2010) Protection of BALB/c mice against Brucella melitensis 16 M infection induced by vaccination with live Escherchia coli expression Brucella P39 protein. Vaccine 28: 1766-1770.
4. Al-Mariri, A., A. Tibor, P. Lestrate, P. Mertens, X. De Bolle & J. J. Letesson, (2002) Yersinia enterocolitica as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39 antigen. Infect Immun 70: 1915-1923.
5. Al-Mariri, A., A. Tibor, P. Mertens, X. De Bolle, P. Michel, J. Godefroid, K. Walravens & J. J. Letesson, (2001) Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. Infect Immun 69: 4816-4822.
6. Baldwin, C. L. & R. Goenka, (2006) Host immune responses to the intracellular bacteria Brucella: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? Critical reviews immunology 26: 407-442.
7. Baral, T. N., S. Magez, B. Stijlemans, K. Conrath, B. Vanhollebeke, E .Pays, S. Muyldermans & P. De Baetselier, (2006) [Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor]. Med Sci (Paris) 22: 914-916.
8. Bleves, S. & G. R. Cornelis, (2000) How to survive in the host: the Yersinia lesson. Microbes Infect 2: 1451-1460.
9. Boschiroli, M. L., V. Foulongne & D. O'Callaghan, (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol 4: 58-64.
10. Bottone, E. J., (1999) Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates. Microbes Infect 1: 323-333.
11. Brehm-Stecher, B. F. & E. A. Johnson, (2004) Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. Microbiol Mol Biol Rev 68: 538-559.
12. Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths & G. Winter, (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352: 624-628.
13. Corbel, M. J., (1997a) Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 3: 213-221.
14. Corbel, M. J., (1997b) Recent advances in brucellosis. J Med Microbiol 46: 101-103.
15. Cortez-Retamozo, V., N. Backmann, P. D. Senter, U. Wernery, P. De Baetselier, S. Muyldermans & H. Revets, (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. Cancer Res 64: 2853-2857.
16. Davis, A. T., (2000) Monoclonal antibody-based therapy of lymphoid neoplasms: what's on the horizon? Semin Hematol 37: 34-42.
17. De Genst, E., D. Saerens, S. Muyldermans & K. Conrath, (2006) Antibody repertoire development in camelids. Dev Comp Immunol 30: 187-198.
18. Deckers, N., D. Saerens, K. Kanobana, K. Conrath, B. Victor, U. Wernery, J. Vercruysse, S. Muyldermans & P. Dorny, (2009) Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of Taenia solium cysticercosis. Int J Parasitol 39: 625-633.
19. Desmyter, A., T. R. Transue, M. A. Ghahroudi, M. H. Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyldermans & L. Wyns, (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. Nat Struct Biol 3: 803-811.
20. Doggrell, S., (2003) Is memantine a breakthrough in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease? Expert Opin Pharmacother 4: 1857-1860.
21. Feldmann, M. & R. N. Maini, (2001) Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annual review of immunology 19: 163-196.
22. Galanakis, E., K. L. Bourantas, S. Leveidiotou & P. D. Lapatsanis, (1996) Childhood brucellosis in north-western Greece: a retrospective analysis. Eur J Pediatr 155: 1-6.
23. Gao, C., S. Mao, F. Ronca, S. Zhuang, V. Quaranta, P. Wirsching & K. D. Janda, (2003) De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods. J Immunol Methods 274: 185-197.

24. Godfroid, J., (2002) Brucellosis in wildlife. Rev Sci Tech 21: 277-286.
25. Gonzalez, L., I. A. Patterson, R. J. Reid, G. Foster, M. Barberan, J. M. Blasco, S. Kennedy, F. E. Howie, J. Godfroid, A. P. MacMillan, A. Schock & D. Buxton, (2002) Chronic meningoencephalitis associated with Brucella sp. infection in live-stranded striped dolphins (Stenella coeruleoalba). J Comp Pathol 126: 147-152.
26. Grant, T., V. Bennett-Wood & R. M. Robins-Browne (1999) ,Characterization of the interaction between Yersinia enterocolitica biotype 1A and phagocytes and epithelial cells in vitro. Infect Immun 67: 4367-4375.
27. Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman & R. Hamers, (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363: 446-448.
28. Harmsen, M. M. & H. J. De Haard, (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol.22–13 :77
29. Hayhurst, A., S. Happe, R. Mabry, Z. Koch, B. L. Iverson & G. Georgiou, (2003) Isolation and expression of recombinant antibody fragments to the biological warfare pathogen Brucella melitensis. J Immunol Methods 276: 185-196.
30. Hurley, J. C., (1 (995Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. Clin Microbiol Rev 8: 268-292.
31. Katja, B., K. Hartmut, M. Pawel, B. Stefan, W. J. Kox & C. D. Spies, (2001) The value of immune modulating parameters in predicting the progression from peritonitis to septic shock. Shock 15: 95-100.
32. Krueger, G. G., R. G. Langley, C. Leonardi, N. Yeilding, C. Guzzo, Y. Wang, L. T. Dooley & M. Lebwohl, (2007) A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. N Engl J Med 356: 580-592.
33. Kurien, B. T. & R. H. Scofield, (2006) Western blotting. Methods 38: 283-293.
34. Laurent, T. C., P. Mertens, J. F. Dierick, J. J. Letesson, C. Lambert & X. De Bolle, (2004) Functional, molecular and structural characterisation of five anti-Brucella LPS mAb .Mol Immunol 40: 1237-1247.
35. Maass, D. R., J. Sepulveda, A. Pernthaner & C. B. Shoemaker, (2007) Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). J Immunol Methods 324: 13-25.
36. McCafferty, J., A. D. Griffiths ,G. Winter & D. J. Chiswell, (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature 348: 552-554.
37. Mertens, P., D. Walgraffe, T. Laurent, N. Deschrevel, J. J. Letesson & X. De Bolle, (2001) Selection of phage-displayed peptides recognised by monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of Brucella. International reviews of immunology 20: 181-199.
38. Pappas, G., N. Akritidis, M. Bosilkovski & E. Tsianos, (2005) Brucellosis. N Engl J Med 352: 2325-2336.
39. Patrícia Gomes Cardoso, G. C. M., Vasco Azevedo and & S. C. Oliveira, (2006) Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factorie 5:13: 11.
40. Plommet ,M., (1991) Minimal requirements for growth of Brucella suis and other Brucella species. Zentralbl Bakteriol 275: 436-450.
41. Revets, H., P. De Baetselier & S. Muyldermans, (2005) Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther 5: 111-124.
42. Saerens, D., G. H. Ghassabeh & S. Muyldermans, (2008) Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. Current opinion in pharmacology 8: 600-608.
43. Saerens, D., J. Kinne, E. Bosmans, U. Wernery, S. Muyldermans & K. Conrath, (2004) Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. J Biol Chem 279: 51965-51972.
44. Tumurkhuu, G., N. Koide, K. Takahashi, F. Hassan, S. Islam, H. Ito, I. Mori ,T. Yoshida & T. Yokochi, (2006) Characterization of biological activities of Brucella melitensis lipopolysaccharide. Microbiol Immunol 50: 421-427.
45. Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D. V. Serreze, F. A.

Goldbaum, F. Haag & F. Koch-Nolte, (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol 198: 157-174.

46. Weynants, V., D. Gilson, A. Cloeckaert, P. A. Denoel, A. Tibor, P. Thiange, J. N. Limet & J. J. Letesson, (1996) Characterization of a monoclonal antibody specific for Brucella smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol 3: 309-314.
47. Winter, G., (1998) Making antibody and peptide ligands by repertoire selection technologies. J Mol Recognit 11: 126-127.
48. Winter, G., A .D. Griffiths, R. E. Hawkins & H. R. Hoogenboom, (1994) Making antibodies by phage display technology. Annual review of immunology 12: 433-455.
49. Wyatt, H. V., (1996) Brucella melitensis can be transmitted sexually. Lancet 348: 615.
50. Yi, E. C. & M. Hackett (2000) ,Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. Analyst 125: 651-656.
51. Young, E.J. (2005). Brucella species. In: Mandell, G. L., J. E. Bennett, R. Dolin (eds). Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier, Churchill, Livingstone, Philadelphia, USA, 2669–2674.
52. Zervos, M. J. & G. Bostic, (1997) Exposure to Brucella in the laboratory. Lancet 349: 651.

Syrian Arab Republic
Damascus University-Science Faculty
Animal Biology Department

Atomic Energy Commission of Syria
Department of Molecular Biology and Biotechnology
Microbiology and immunology Division

Application of Nanobodies technique in *Brucella* diagnosis from *Yersinia enterocolitica* O9

Thesis submitted for Master's degree By

Alia Al-Naoufi

Supervisors

Major Supervisor

Prof. Dr. Abd Al-Rhman Mourad

Co-Supervisor

Dr. Ayman Al-Mariri

Scientific Cooperation

Dr.Abd Al-Qader Abbady